Ein Beitrag zur Untersuchung der Aromatenbiosynthese in Saccharomyces cerevisiae

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

WERNER GOEBEL
aus Laurahütte/Oberschlesien

1965

8454

Ein Beitrag

zur Untersuchung der Aromatenbiosynthese

in Saccharomyces cerevisiae

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

W e r n e r G o e b e l

aus Laurahütte/Oberschlesien

1965

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1965

D e k a n	:	Prof. Dr.Dr. G. Weitzel
1. Berichterstatter	:	Prof. Dr. F. Lingens
2. Berichterstatter	:	Prof. Dr. H. Zähner

Die vorliegende Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Anleitung von Herrn Dozenten Dr. F. L i n g e n s im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die vielen wertvollen Anregungen und die mir bei der Arbeit gewährte Freizügigkeit und großzügige Unterstützung danke ich Herrn Dozenten Dr. F. Lingens sehr herzlich.

Dem Direktor des Chemischen Institutes, Herrn Professor Dr. Eugen Müller, möchte ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes danken.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	Seite
Aufklärung von Biosyntheseketten mit Hilfe von Mikroorganismen	14

THEORETISCHER TEIL

1. Die Aromatenbiosynthese nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse	18
a. Der Grundzweig der Aromatenbiosynthese	20
b. Die Biosynthese des Tryptophans	21
c. Die Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanin	24
d. Die Biosynthese von p-Aminobenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure	25
e. Über bekannte Zwischenstufen in der Biosynthese des Tryptophans bei Saccharomyces cerevisiae	25
2. Die Problemstellung der eigenen Arbeit	27
A. Über die Vorgänge in der Kulturflüssigkeit während der Akkumulation	28
a. Produkte des Kohlenhydratstoffwechsels	28
b. Nucleinsäurebruchstücke	29
c. Aminosäuren und Proteinbruchstücke	29
d. Porphyrine	31

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547609_0038

Seite

B. Untersuchungen an biochemischen Mangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae mit genetischem Block hinter der Verzweigungsstelle in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren 35

I. Tryptophanmutanten 36

II. Tyrosinmutanten 44

III. Phenylalaninmutante 45

IV. p-Aminobenzoesäuremutante 46

V. Phenylalanin/Tyrosin-Mutanten 46

VI. Tryptophanmutante HK 167 48

VII. Das Problem der 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei Hefe 49

VIII. Akkumulatbildung bei Tryptophanmutanten von Bakterien mit genetischem Block zwischen Chorisminsäure und Anthranilsäure 50

IX. Über den Einfluß von Hemmstoffen auf die Akkumulatbildung bei Verzweigungsmutanten von Hefe und Bakterien 52

X. Umwandlung von Zwischenprodukten und Endprodukten der Aromatenbiosynthese durch Hefewildstamm und Bakterienwildstamm 56

C. Über die Tryptophanbiosynthese bei Hefe 64

I. Der Weg von der Chorisminsäure zur Anthranilsäure 64

II. Der Weg von der Anthranilsäure zum Tryptophan bei Hefe 69

1.) Isolierung und Identifizierung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose 72

Seite

2.) Versuche zur Aufklärung der Akkumulate A I und A II 73

3.) Versuche zur Synthese von A I 80

4.) Biologische Untersuchungen bei den Anthranilsäureestern A I und A II 83

III. Die Indolderivate 84

1.) Strukturaufklärung von I_3 86

a.) Spaltung mit Natriumperjodat 89

b.) Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid 89

2.) Strukturaufklärung von I_2 90

a.) Spektroskopische Befunde 91

b.) Chemische Umsetzungen 92

c.) Synthese von Indolyl-3-ribit und Indolyl-3-mannit 93

d.) Anreicherung von I_2 über Säulenchromatographie 94

e.) Molekulargewichtsbestimmung von I_2 95

f.) Anreicherung der aktiven Komponente, die zur Spontanbildung von I_2 führt 96

g.) Synthese von 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 96

h.) Identität von I_2 mit 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol 1,2 97

3.) Die Umwandlung von Indolyl-3-glycerin in 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol und 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 97

4.) Die biologischen Befunde bei den Indolderivaten 102

a.) Wachstumswirksamkeit 102

b.) Enzymatische Umwandlung von 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phorphorsäure in die 104

Seite

Phosphorsäureester des 3,3-Di-indolyl-(3)-propandiols-1,2 und des 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanols 104

5.) Akkumulation bei E.coli-Mutanten mit genetischem Block vor dem Indol 106

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Verwendete Stämme 108

B. Züchtung der Hefen und Bakterien

C. Allgemeine Methoden 111

D. Isolierung der Akkumulationsprodukte 115

E. Reinigung der Porphyrine 117

F. Untersuchung an Verzweigungsmutanten 119

I. Identifizierung der Substanzen 119

a.) p-Hydroxybenzoesäure 119

b.) p-Aminobenzoesäure 119

c.) Phenylbrenztraubensäure und p-Hydroxy-phenylbrenztraubensäure 120

d.) Tyrosol 120

e.) Phenyläthanol 121

f.) Chorisminsäure 122

g.) 2,3-Dihydroxybenzoesäure 123

h.) Indolsubstanzen 123

II. Akkumulation unter Zusatz von Hemmstoffen 124

III. Umwandlung von Shikimisäure durch Hefe und Bakterien 124

IV. Abbau der aromatischen Aminosäuren 125

V. Identifizierung der Aminosäure-Abbauprodukte und der Shikimisäure-Umwandlungsprodukte 125

Seite

a.) 3,4-Dihydroxybenzoesäure 125

b.) p-Fluorphenyläthanol 126

c.) p-Fluorbenzoesäure 126

d.) p-Fluorphenylmilchsäure 127

e.) 4-Methyltryptophol 127

G. Untersuchungen mit Enzymrohextrakten 127

a.) Bereitung der Enzymextrakte 127

b.) Enzymatische Untersuchung von N-Pyrovylanthranilsäure und N-Glutaminylanthranilsäure 128

c.) Hemmwirkung der Methyltryptophane auf die Anthranilsäurebildung 129

H. Untersuchungen an Hefemangelmutanten mit Block hinter der Anthranilsäure 130

I. Isolierung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose über Kieselgel-H-Säule 130

II. Untersuchung der Anthranilsäureester A I und A II 131

a.) Behandlung mit Säure 131

b.) Spaltung von A I mit Natriumäthylat 132

c.) Reduktion von A I mit $LiAlH_4$ 132

d.) Enzymatische Untersuchungen an A I 132

e.) Wachstumstest mit den Anthranilsäureestern 133

III. Versuche zur Synthese von A I 134

a.) Herstellung des Silbersalzes der o-Nitrobenzoesäure 134

b.) Umsetzung des Silbersalzes der o-Nitrobenzoesäure mit Bromacetaldehydacetal 134

Seite

c.) Reduktion der Reaktionsprodukte mit H_2/Pt 135

d.) Acetalspaltung mit Salzsäure 135

IV. Isolierung und Strukturaufklärung der Indolderivate 136

a.) Isolierung der Indolderivate 136

b.) Chemische Umsetzungen mit Indolderivat I_3 138

1.) Spaltung mit Natriumperjodat 138

2.) Reduktion mit $LiAlH_4$ 138

3.) Synthese von 3-Indolyl-(3)-propandiol-1,2 139

c.) Untersuchung des Indolderivates I_2 139

1.) Quantitative Bestimmung der I_2-Bildung mit und ohne Hefezellen 139

2.) Molekulargewichtsbestimmung von I_2 140

3.) Chemische Umsetzungen mit Indolderivat I_2 141

4.) Darstellung von Indolyl-3-mannit 143

5.) Darstellung von Indolyl-3-ribit 144

6.) Reduktion von Indolylglyoxalsäuremethylester mit $LiAlH_4$ 144

7.) Darstellung von 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 144

d.) Chemische Umwandlung von 3-Indolyl-(3)-glycerin in 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 und 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol 145

e.) Umwandlung von 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 in 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol 146

Seite

V. Biologische Befunde bei den Indolderivaten 147
a.) Wachstumstest 147
b.) Wachstum der Mutante E 107 auf 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 148
c.) Enzymatische Umwandlung von 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure 149
d.) Behandlung der phosphatpositiven Indolderivate mit Polidase S. 150
VI. a.) Nachweis von Indolyl-3-glycerin und 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure bei Mutanten von E. coli 150
b.) Akkumulation unter Zusatz von Natriumfluorid und Äthylendiamintetraessigsäure 151

ZUSAMMENFASSUNG 153

LITERATURVERZEICHNIS 156

EINLEITUNG

Aufklärung von Biosyntheseketten mit Hilfe von Mikroorganismen

Aminosäuren werden ebenso wie Purine, Pyrimidine und Vitamine von Mikroorganismen aus einfachen Stoffen aufgebaut. Mikroorganismen eignen sich daher am besten für die Aufklärung der Biosyntheseketten dieser lebenswichtigen Stoffe.

Die Biosynthese einer bestimmten Aminosäure X verläuft in mehreren Reaktionsschritten in der Zelle: A $\longrightarrow$ B $\longrightarrow$ C $\cdots\rightarrow\cdots\rightarrow\cdots\rightarrow$ X. Jeder einzelne Schritt wird dabei im allgemeinen von einem ganz spezifischen Enzym katalysiert. Solange die Zelle intakt ist, d.h. alle Enzyme vorhanden sind, läuft die Synthese bis zum Endprodukt durch, ohne daß nachweisbare Mengen der einzelnen Zwischenprodukte auftreten. Die Synthese der Aminosäuren unterliegt einem Regulationsmechanismus durch das Endprodukt, der die überschießende Bildung der Endprodukte verhindert. Die Synthese der Enzyme ist gengesteuert. Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse weiß man, daß jeweils ein Gen für die Bildung eines Enzym verantwortlich ist. Das genetische Material ist die Desoxyribonucleinsäure (DNS), die aus zwei Pyrimidinbasen, Cytosin und Thymin, zwei Purinbasen, Guanin und Adenin, der Desoxyribose und Orthophosphorsäure besteht. Diese sechs Komponenten sind in polymerer Anordnung miteinander verknüpft. Die kleinsten Untereinheiten der DNS, bestehend aus einer Base, einem Pentosemolekül und einer Orthophosphatgruppe, nennt man Nucleotide. Wie man heute weiß, codieren drei bestimmte solcher Nucleotide (Triplett) der DNS jeweils eine Aminosäure bei der Synthese des Enzymproteins. Durch Einwirkung von Röntgenstrahlen, UV-Strahlen oder bestimmten chemischen Agenzien (salpetriger Säure, Hydrazin, Peroxyde und Alkylierungsmittel) kann

man die DNS so verändern, daß die ursprünglichen Tripletts umgewandelt werden, bzw. neue Tripletts entstehen. Dadurch wird die Bildung eines bestimmten Enzyms entweder völlig ausgeschaltet, oder es kommt zur Bildung von fehlerhaftem Enzymprotein, das nicht mehr in der Lage ist, den entsprechenden Reaktionsschritt zu katalysieren. Ein derart mutierter Organismus kann das Endprodukt der Biosynthesekette nicht mehr bilden. Das Wachstum dieser Mutante ist dann von der Zufuhr des Endproduktes oder von Zwischenprodukten der Synthesekette, die hinter dem genetischen Block liegen, abhängig. Mit Hilfe derartiger Mutanten ist es möglich, Zwischenprodukte der Biosynthesekette zu erhalten. Liegt beispielsweise in einer Reaktionskette $A \xrightarrow{a} B \xrightarrow{b} C \rightarrow \rightarrow \rightarrow X$ der genetische Block so, daß das Enzym b, welches den Schritt $B \rightarrow C$ katalysiert, ausfällt, dann wird unter bestimmten Bedingungen nur das Zwischenprodukt B gebildet. Da diese Substanz jedoch von der Zelle nicht weiterverarbeitet werden kann und ihre Bildung auch nicht mehr der erwähnten Regulation durch das Endprodukt unterliegt, wird sie überschießend gebildet und durch die Zellmembran nach außen abgegeben. Durch verschiedene Anreicherungsverfahren lassen sich die akkumulierten Zwischenprodukte isolieren. Anschließend kann mit analytischen Methoden ihre Struktur ermittelt werden. Mit Hilfe einer Reihe von Mutanten, die ihren genetischen Block an verschiedenen Stellen einer bestimmten Synthesekette haben, kann man die gesamte Reaktionsfolge aufklären. So sind z.B. für die vollständige Aufklärung der Biosynthesekette $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$ insgesamt vier geeignete blockierte Mutanten notwendig, wie nachfolgendes Schema zeigt:

Mutante	blockierter Schritt	Akkumulat	Wachstum mit
1	$D \rightarrow E$	D	E
2	$C \rightarrow D$	C	D,E
3	$B \rightarrow C$	B	C,D,E
4	$A \rightarrow B$	A	B,C,D,E

Aus der wachstumsfördernden Wirkung der isolierten Akkumulate A, B, C und D auf die einzelnen Mutanten 1 - 4 ergibt sich die Reaktionsfolge der Zwischenprodukte in der Biosynthesekette. Die Mutante 4 wächst z.B. mit den Akkumulaten der Mutanten 1 - 3, während Mutante 3 nur noch von den Mutanten 1 und 2 gefüttert werden kann. Das von der Mutante 4 akkumulierte Zwischenprodukt muß daher in der Synthesekette vor dem von Mutante 3 liegen.

Mutanten, die in einem einzigen Reaktionsschritt einer unverzweigten Biosynthesekette blockiert sind und deshalb auf einen Wuchsstoff angewiesen sind, nennt man auxotroph im Gegensatz zum prototrophen Wildstamm.

Neben diesen unverzweigten Biosynthesketten kennt man noch eine Reihe verzweigter. In einem Grundzweig verläuft hierbei die Biosynthese zunächst über eine Reihe gemeinsamer Vorprodukte bis zu einem Verzweigungspunkt P, von dem aus mehrere Endprodukte gebildet werden:

Mutanten, die im Grundzweig einer solchen verzweigten Biosynthesekette blockiert sind, verhalten sich polyauxotroph, d.h., sie benötigen zum Wachsen gleichzeitig die Endprodukte X, Y und Z. Der erste Schritt einer derartigen verzweigten Biosynthesekette wird meist von mehreren Enzymen, sog. Isoenzymen, katalysiert. Diese Isoenzyme führen zwar alle dieselbe Reaktion durch, ihre Aktivität wird aber jeweils von einem anderen Endprodukt, im obigen Beispiel also entweder von X oder Y oder Z, reguliert.

Bei dem von der Zelle abgegebenen Akkumulat handelt es sich nicht in allen Fällen um echte Zwischenprodukte der Biosynthese-

kette. Durch intrazelluläre Umwandlung, z.B. Entphosphorylierung von Phosphorsäureestern oder durch chemische Umwandlung von labilen Akkumulaten in der Kulturflüssigkeit, können Kunstprodukte entstehen. Derartige Sekundärprodukte haben keine wachstumsfördernde Eigenschaft. Andererseits gibt es echte Zwischenprodukte, z.B. Indolyl-(3)-glycerin-l-phosphat in der Biosynthese des Tryptophans, die trotzdem nicht als Wuchsstoff für geeignete Mutanten dienen können, da sie nicht von der Zelle aufgenommen werden.

Der Enzymversuch ist die sicherste Methode, um ein echtes Zwischenprodukt von einem Kunstprodukt zu unterscheiden. Enzymextrakte oder isolierte Enzyme, die einen einzigen Syntheseschritt katalysieren, sind daher ein weiteres wichtiges Hilfsmittel zur Aufklärung von Syntheseketten. Die Enzyme werden durch Extraktion und Anreicherung aus dem Wildstamm oder geeigneten Mutanten gewonnen. Man verwendet dafür Mutanten, die im zu untersuchenden Syntheseschritt nicht blockiert sind. Die Synthese eines Zwischenproduktes kann so in vitro untersucht werden. Im angeführten Beispiel wandelt der Enzymextrakt der Mutante 3 das Zwischenprodukt A in B um. Das angereicherte Enzymsystem des Wildstammes, das alle Enzyme der Reaktionskette A - E enthält, ist in der Lage, A in das Endprodukt E umzuwandeln.

Die Isotopenmarkierung ist eine weitere Methode, die in einigen Fällen mit Erfolg zur Aufklärung von Biosyntheseketten herangezogen wurde. Verbindungen mit stabilen oder radioaktiven Isotopen können im Fütterungstest oder im Enzymversuch angeboten werden. Der Einbau der markierten Atome wird durch geeignete Abbaumethoden ermittelt.

B. THEORETISCHER TEIL

1. Die Aromatenbiosynthese nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse

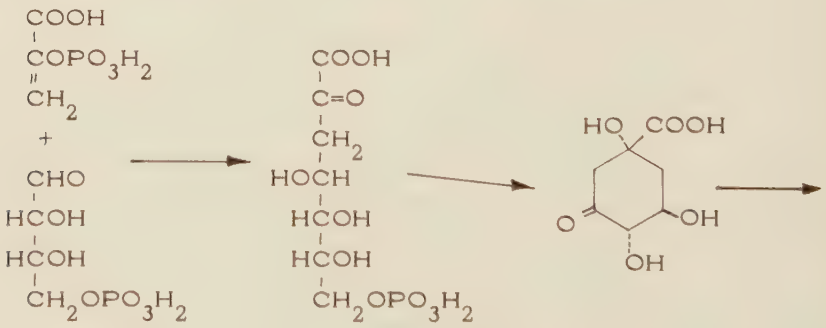
a) Der Grundzweig der Aromatenbiosynthese

Mit Hilfe der eingangs angeführten Methoden konnte die Aromatenbiosynthese in den letzten Jahren weitgehend aufgeklärt werden.

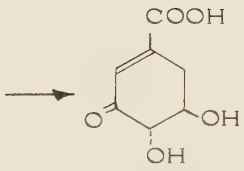
B.D. Davis (1) fand bei seinen Untersuchungen an Mutanten von Escherichia coli und Neurospora crassa, daß es polyauxotrophe Einfachmutanten gibt, die auf die gleichzeitige Zufuhr von Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin, p-Aminobenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure angewiesen sind. Daraus zog er den Schluß, daß die aromatischen Aminosäuren zusammen mit p-Aminobenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure aus gemeinsamen Vorstufen einer verzweigten Biosynthesekette gebildet werden.

Die Ausgangsstoffe für die Bildung des Aromatenringes sind Phosphoenolbrenztraubensäure und Erythrose-4-phosphat. Die Kondensation dieser beiden Komponenten führt zur Bildung von 2-Keto-3-desoxy-D-araboheptonsäure-7-phosphat (2) (Schema I, I). Dieser erste Schritt in der Aromatenbiosynthese wird von 3 Isoenzymen ausgeführt, wie Shive (3) sowie Brown und Doy (4) zeigen konnten. Diese Isoenzyme sind jeweils durch eine der aromatischen Aminosäuren hemmbar. Für die Cyclisierung dieser Verbindung zu 5-Dehydrochinasäure (II) nehmen Srinivasan und Rothschild (5) ein an mehrere Enzyme gebundenen Mechanismus an. Der nächste Reaktionsschritt - die Dehydratisierung von 5-Dehydrochinasäure zur 5-Dehydroshikimisäure (III) - wird von der Dehydrochinase gesteuert, die aus E.coli-Extrakten gewonnen werden konnte. Salomon und Davis (6) zeigten, daß

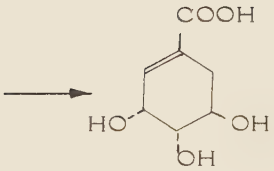
Shikimisäure (IV) unmittelbar aus der 5-Dehydroshikimisäure entsteht. Shigeura und Sprinson (7) isolierten die Shikimisäure als Akkumulat aus den Medien von E.coli- und A. aerogenes-Mutanten. Neben der Shikimisäure wurden noch zwei weitere Substanzen nachgewiesen, die bei saurer Hydrolyse Shikimisäure bildeten. Die eine wurde als Shikimisäure-5-phosphat (V) identifiziert (8), die andere - als "Z_1-compound" in die Literatur eingegangen - stellt den 3-Enolbrenztraubensäureäther der Shikimisäure (VI) dar. (9,10). In allerjüngster Zeit konnte Gibson (11,12) zeigen, daß das Verzweigungsprodukt in der Biosynthese der Aromaten der 3-Enolbrenztraubensäureäther der trans-3,4-Dihydroxycyclohexa-1,5-diencarbonsäure ist (VII), der von ihm Chorisminsäure genannt wurde. Die Chorisminsäure isolierte er als Akkumulat aus dem Medium einer mehrfach blockierten Mutante von Aerobacter aerogenes. Mit Hilfe von Enzymextrakten geeigneter Mutanten konnte er die Chorisminsäure in Anthranilsäure, Prephensäure, Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und p-Hydroxybenzoesäure umwandeln (13,14). Damit ist ihre Stellung als Verzweigungsprodukt in der Biosynthese der Aromaten gesichert.



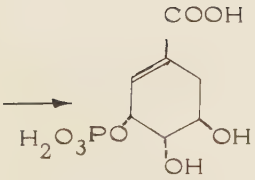
I II



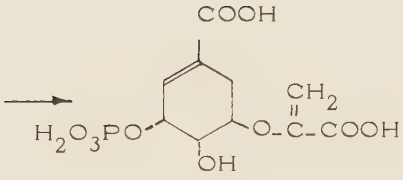
III



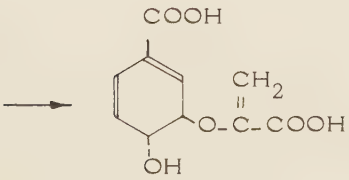
IV



V



VI



VII

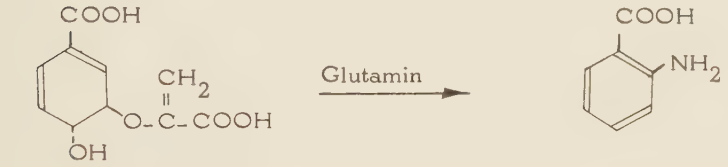
Schema 1: Grundzweig der Aromatenbiosynthese

b) Die Biosynthese des Tryptophans

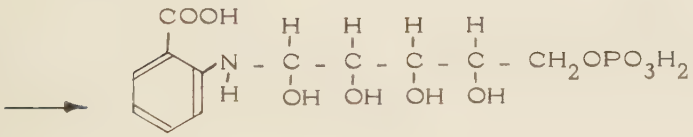
Nach der Chorisminsäure gabelt sich der Aromatenbiosyntheseweg in fünf Zweige, die zu den aromatischen Aminosäuren, zur p-Aminobenzoesäure und zur p-Hydroxybenzoesäure führen.

Im Tryptophanzweig ist das nächste gesicherte Zwischenprodukt die Anthranilsäure (VIII) (15,16). Über die Syntheseschritte zwischen Chorisminsäure und Anthranilsäure herrscht noch keine Klarheit. Man weiß lediglich, daß Glutamin als Stickstoffdonator dient (17). Durch Kondensation mit Phosphoribosylpyrophosphat entsteht aus der Anthranilsäure das N-o-Carboxyphenylribosylamin-5-phosphat (IX), das in einer Amadoriumlagerung in die stabilere Form des 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose-5-phosphats (X) übergeführt wird (18). Die entphosphorylierte Form des letzteren konnten Doy und Gibson (19) bei Mutanten von Aerobacter aerogenes- und E.coli-Mutanten, die zwischen Anthranilsäure und Indol blockiert waren, als Akkumulat isolieren. Der nachfolgende Ringschluß führt unter Erhalt des Stickstoffes der Anthranilsäure (20) und Eliminierung ihrer Carboxylgruppe (21) zum 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphat (XI) (22). Gibson, Jones und Teltscher (23) isolierten aus der Kulturflüssigkeit einer Tryptophanmangelmutante von E.coli, F. Lingens (24) bei der Mutante try3 von Salmonella typhimurium eine Indolverbindung, die sich als Indolyl-3-glycerin herausstellte (25). Auch hier wird also das Zwischenprodukt in der entphosphorylierten Form als Akkumulat an das Medium abgegeben. Die beiden letzten Schritte der Tryptophansynthese werden von einem Enzymkomplex, der Tryptophansynthetase, katalysiert, das Pyridoxalphosphat als Cofaktor benötigt (26). Yanofsky (27,28) hat sich intensiv mit der Reindarstellung und den Eigenschaften dieses Enzymkomplexes beschäftigt. Danach besteht er aus zwei Proteinteilen A und B, die jeweils einen der beiden letzten Reaktionsschritte katalysieren.

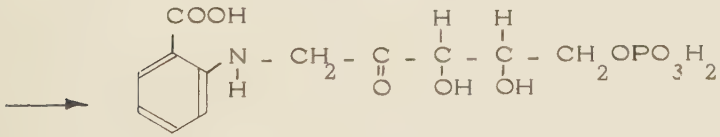
Protein A bewirkt die Spaltung von Indolyl-3-glycerinphosphat in Indol und Glycerinaldehyd-3-phosphat, während Protein B für die Umsetzung von Indol mit L-Serin zu L-Tryptophan zuständig ist. Die beiden Proteinteile A und B können getrennt mutiert werden. Im Falle eines Defektes von Protein A wird Indolyl-glycerin als Akkumulat abgegeben, während eine Mutation von Protein B zur Bildung von Indol führt. Das Indol wurde schon frühzeitig (29) als Wuchsstoff bei Tryptophanmutanten von E.coli, Salmonella typhimurium und Corynebacterium gefunden.



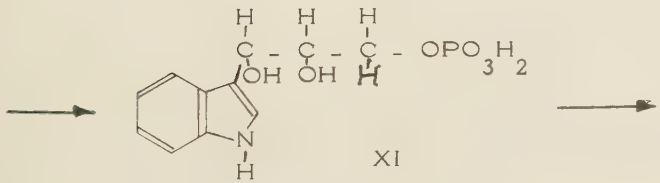
VIII



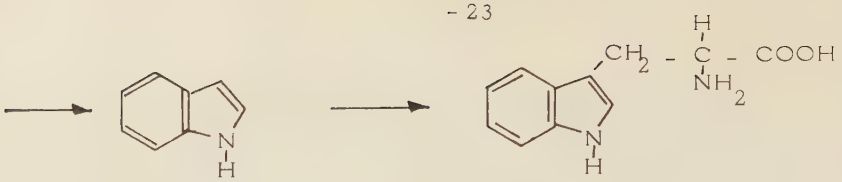
IX



X

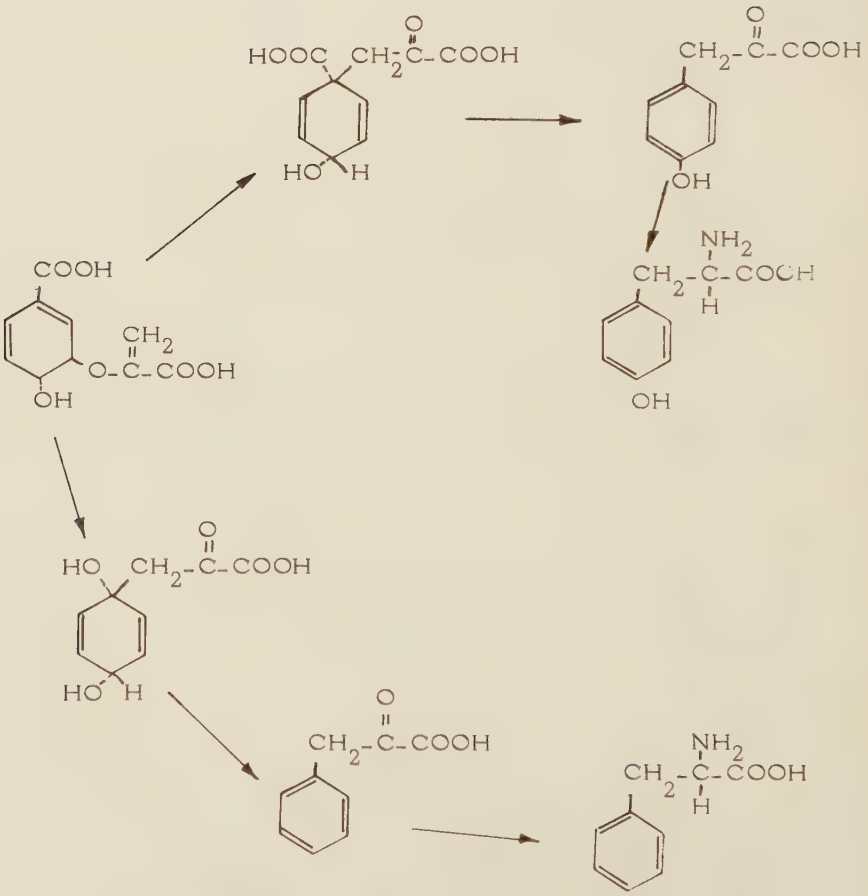


XI



XII XIII

Schema 2: Biosynthese des Tryptophan



Schema 3: Biosynthese von Phenylalanin und Tyrosin

c) Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanin

Phenylalanin und Tyrosin haben nach der Verzweigung nochmals ein gemeinsames Vorprodukt, die Prephensäure (30). Die Prephensäure kann man sich in einer Art Claisen-Umlagerung aus der Chorisminsäure entstanden denken. Diese Reaktion ist von Gibson (11) sowohl chemisch als auch enzymatisch durchgeführt worden. Wie derselbe Autor in allerjüngster Zeit zeigen konnte (14), wird auch dieser Schritt von zwei Isoenzymen, die er als Chorismatmutasen T und P bezeichnete, katalysiert. Nach seinen enzymatischen Untersuchungen ist es wahrscheinlich, daß die Mutase T zusammen mit der Prephenatdehydrogenase einen Enzymkomplex bildet, der die Umwandlung von Chorisminsäure über die Prephensäure zur p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure katalysiert. Diese wird dann von einer Transaminase in Tyrosin umgewandelt.

Analog soll nach Gibson auch die Mutase P mit der Prephenatdehydratase einen Enzymkomplex bilden, der zur Phenylbrenztraubensäure führt. Der Endschritt zum Phenylalanin verläuft analog wie beim Tyrosin.

In einem gewissen Widerspruch zu den Arbeiten von Gibson steht ein kürzlich erschienener Beitrag von Colburn und Tatum (31). Diese Autoren fanden bei einer Mutante von N.crassa, die nach genetischer Analyse eine Einfachmutante darstellt, als Akkumulat Prephensäure. Die Säure dürfte aber, nach den Anschauungen von Gibson, als echtes Akkumulat nicht auftreten, vor allem nicht bei einer einfach blockierten Mutante. Tatum et al. stellen auf Grund ihrer Ergebnisse die Hypothese auf, daß es nach der Prephensäure noch einen weiteren gemeinsamen Enzymschritt geben soll, nach dem erst die Verzweigung in Phenylalanin und Tyrosin beginnt. Allerdings fehlt bislang jeglicher experimenteller Beweis für ihre Behauptung.

d) Biosynthese von p-Aminobenzoesäure und p-Hydroxybenzoesäure

Über mögliche Zwischenprodukte, die zwischen der Chorisminsäure und p-Hydroxybenzoesäure bzw. p-Aminobenzoesäure liegen, ist nichts bekannt. Gibson (11) konnte die enzymatische Umwandlung von Chorisminsäure in p-Hydroxybenzoesäure durchführen.

Völlige Unklarheit herrscht auch über die Schritte nach der Verzweigung bis zur p-Aminobenzoesäure. Gibson (32) ist es gelungen, die Chorisminsäure enzymatisch auch in p-Aminobenzoesäure umzuwandeln.

e) Über bekannte Zwischenstufen in der Biosynthese des Tryptophans bei Saccharomyces cerevisiae

Die Biosynthese des Tryptophans bei Hefen ist bisher noch wenig untersucht worden.

S h i k i m i s ä u r e isolierten Lingens und Hellmann (33) bei einer polyauxotrophen Mutante von S. cerevisiae, die auf die Zufuhr von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und p-Aminobenzoesäure angewiesen ist. Shikimisäure-5-phosphat und das Brenztraubensäurekonjugat der Shikimisäure, die Davis und Mingioli (34) regelmäßig bei Mutanten von Enterobacteriaceae neben der Shikimisäure gefunden hatten, traten dabei nicht auf.

Ein Stickstoff-freies Vorprodukt, das mit der von Gibson beschriebenen C h o r i s m i n s ä u r e (12) identisch zu sein scheint, fanden Lingens und Lück (35) bei einer Tryptophanmangelmutante von S. cerevisiae, die vor der Anthranilsäure blockiert ist.

Parks und Douglas (36) untersuchten eine S. cerevisiae-Mutante, die mit Tryptophan und Indol, aber nicht mit Anthranilsäure zum Wachstum gebracht werden kann, d.h. ihren genetischen Block hinter der Anthranilsäure hat. Als Akkumulate dieser Mutante fanden sie Anthranilsäure und 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyfructose. Die letztgenannte Verbindung stellt kein echtes Zwischenprodukt dar, denn sie konnte weder enzymatisch umgewandelt werden, noch konnte das daraus eventuell zu erwartende Indolyl-3-erythrit als Akkumulat jemals gefaßt werden (37, 38, 39).

Eddy und Kirsop (40, 41) isolierten aus der Kulturflüssigkeit eines auf die Zufuhr von Pyridoxalphosphat angewiesenen Stammes von S.cerevisiae (NCYC 77), Anthranilsäure, Indol, Tryptophol sowie ein nichtidentifiziertes Indolderivat, das weder Indolyl-3-glycerin noch Indolyl-3-erythrit darstellt.

2. Die Problemstellung der eigenen Arbeit

Gibson hatte bei der Entdeckung der Chorisminsäure eine dreifach blockierte Mutante verwendet, der die beiden Chorismatmutasen P und T fehlten, und die im Tryptophanzweig einen Block zwischen Anthranilsäure und dem Ribosylamin der Anthranilsäure hat (14). Es war daher von besonderem Interesse, zu erfahren, was eine einfach blockierte Mutante, die unmittelbar hinter dem Verzweigungspunkt den genetischen Block hat, akkumuliert. Einfach blockierte Verzweigungsmutanten kennt man in der Aromatenbiosynthese insgesamt 4, nämlich Mutanten, denen die Chorismatmutase P fehlt (Phenylalaninmutanten), Tyrosinmutanten mit defekter Chorismatmutase T, Tryptophanmutanten mit genetischem Block zwischen Chorisminsäure und Anthranilsäure und p-Aminobenzoesäuremutanten, die zwischen Chorisminsäure und p-Aminobenzoesäure blockiert sind. Besonders interessant war dabei die Frage nach der Akkumulatbildung bei diesen Tryptophanmangelmutanten. Wie bereits erwähnt, herrscht über mögliche Zwischenprodukte im Schritt Chorisminsäure ⟶ Anthranilsäure noch einige Unklarheit. Tryptophanmutanten des obigen Typs wären durchaus geeignete Objekte, derartige Vorstufen zu akkumulieren. Alle diese Untersuchungen wurden vornehmlich mit Mutanten von S.cerevisiae durchgeführt, weil bei diesem Mikroorganismus noch sehr wenig Untersuchungen vorliegen. Gerade bei Hefen sind auch im Biosyntheseschritt Anthranilsäure ⟶ Tryptophan, wie bereits kurz angedeutet, unbekannte Verbindungen beobachtet worden, die sich nicht in das bekannte Schema der Tryptophanbiosynthese einordnen lassen. Diesem Problem wurde daher ein großer Teil der Arbeit gewidmet.

A. Über die Vorgänge in der Kulturflüssigkeit während der Akkumulation bei Hefen

Mutanten unterscheiden sich vom Wildstamm dadurch, daß sie ein bestimmtes Endprodukt nicht mehr aus einfachen Grundstoffen synthetisieren können. Die Biosynthese bleibt bei dem Zwischenprodukt, hinter dem der genetische Block liegt, stehen. Um dieses Zwischenprodukt, das Akkumulat im eigentlichen Sinn, zu gewinnen, züchtet man die Hefemutanten zunächst in einem Komplettmedium, in dem alle Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Vitamine enthalten sind, vor. Anschließend werden die Hefezellen nach Abzentrifugieren und Auswaschen in einem Minimalmedium, das aus einer Kohlenstoffquelle (Glucose oder Saccharose) und anorganischen Salzen besteht, zum Stoffwechseln gebracht. In diese Kulturflüssigkeit geben die Mutanten ihre Akkumulate ab. Daneben spielen sich aber im Minimalmedium noch eine Reihe von Vorgängen ab, die zur Produktion von Substanzen führen, welche mit dem eigentlichen Akkumulat nicht im Zusammenhang stehen. Da diese Produkte jedoch oftmals einen störenden Einfluß bei der Aufarbeitung des eigentlichen Akkumulats ausüben und deswegen schon mehrfach zu Fehlschlüssen hinsichtlich der untersuchten Biosyntheseprodukte geführt haben, wurden diese sekundären Produkte ebenfalls isoliert und identifiziert.

a) Produkte des Kohlehydratstoffwechsels

Lingens und Lück (42) hatten bei S.cerevisiae eine extracelluläre Invertase nachweisen können, die Saccharose in Glucose und Fructose spaltet. Während die Glucose in den weiteren Kohlenhydratcyklus übergeht, bleibt die Fructose im Minimalmedium liegen, wo sie sich leicht nachweisen läßt. An Zwischenprodukten des

Kohlenhydratstoffwechsels ließen sich außerdem größere Mengen Glycerin, Glycerinaldehyd, Brenztraubensäure und Bernsteinsäure isolieren.

b) Nucleinsäurebruchstücke

Das Auftreten von Nucleinsäurebruchstücken im Akkumulationsmedium, das auch schon von anderen Autoren beobachtet wurde (43,44,45,46), darf wohl auf eine teilweise Lysis der Hefezellen zurückgeführt werden. Adenosin konnte identifiziert werden, zwei weitere Nucleinsäurebruchstücke mit UV-Maxima zwischen 250-260 nm wurden papierchromatographisch nachgewiesen.

c) Aminosäuren und Proteinbruchstücke

Auf demselben Vorgang dürfte auch das Auftreten von freien Aminosäuren und Proteinbruchstücken in der Kulturflüssigkeit zurückzuführen sein (47,48,49). Dieses relativ hohe Auftreten von freien Aminosäuren ist von besonderer Wichtigkeit bei der Untersuchung der Biosynthesen der aliphatischen und aromatischen Aminosäuren. Es wurde daher eine quantitative Analyse der im Medium enthaltenen freien Aminosäuren sowie der Proteinbruchstücke durchgeführt. 8 ltr. Kulturflüssigkeit einer Tryptophanmutante (DX 12) wurden präpariert und auf 25 ml eingeengt. Darin sind an freien Aminosäuren enthalten:

Tabelle 1:

Alanin	2,446 µMol/ml
Glutaminsäure	1,232 µMol/ml
Glycin	0,561 µMol/ml
Summe:	
Glutamin, Asparagin	
Serin	0,813 µMol/ml

Tyrosin	0,389 µMol/ml
Threonin	0,302 µMol/ml
Phenylalanin	0,283 µMol/ml
Valin	0,150 µMol/ml
Prolin	0,141 µMol/ml
Asparaginsäure	0,093 µMol/ml
Isoleucin	0,050 µMol/ml
Leucin	0,028 µMol/ml
Unbek. Aminosäure	0,201 µMol/ml

Nach saurer Hydrolyse, wobei also sowohl die freien Aminosäuren wie auch die durch Hydrolyse aus den Proteinbruchstücken entstandenen Aminosäuren erfaßt sind, ergaben sich folgende Werte:

Tabelle 2:

Alanin	3,3325 µMol/ml
Glutaminsäure	1,815 µMol/ml
Glycin	0,880 µMol/ml
Prolin	0,860 µMol/ml
Asparaginsäure	0,407 µMol/ml
Serin	0,323 µMol/ml
Isoleucin	0,315 µMol/ml
Phenylalanin	0,330 µMol/ml
Tyrosin	0,240 µMol/ml
Threonin	0,223 µMol/ml
Valin	0,290 µMol/ml
Leucin	0,214 µMol/ml
Lysin	Die basischen Aminosäuren
Arginin	konnten wegen des vorhan-
Histidin	denen Ammoniaks nicht
	quantitativ bestimmt werden.

d) Porphyrine

Extrahierte man die Minimalmedien der Hefemutanten nach Beendigung der Akkumulation mit Essigester, so war in der organischen Phase unter der UV-Lampe eine mehr oder weniger intensive rote Fluoreszenz zu beobachten. Diese Rotfluoreszenz konnte in variierender Intensität mit einer Ausnahme bei allen ca. 50 untersuchten Hefemutanten beobachtet werden. Mit 2 n Salzsäure ließ sich die Substanz, die diese rote Fluoreszenz hervorruft, quantitativ aus der Essigesterphase ausschütteln. Neutralisierte man die Salzsäureschicht auf pH 4-5, so ging die Substanz wieder quantitativ in die Essigesterphase über. Durch mehrmaliges Umextrahieren ließ sich eine gute Reinigung der rotfluoreszierenden Substanz erreichen. Aus mehreren Litern Kulturflüssigkeit erhielt man so eine stark rotgefärbte Lösung. Das Absorptionsspektrum zeigte zwischen 740 nm und 480 nm in Chloroform, Essigester, Äther oder Methanol als Lösungsmittel 4 Banden steigender Intensität. Beim Ansäuern wurde das Absorptionsspektrum zweibandig. Außerdem lag bei 399 nm noch eine sehr intensive Bande, deren Lage sich im sauren und alkalischen Milieu praktisch nicht änderte. Reduzierte man eine Lösung der rotfluoreszierenden Substanz mit Zink/Salzsäure, so verschwand die rote Fluoreszenz und tauchte nach mehrstündigem Stehenlassen an der Luft wieder auf. Außerdem ließ sich die rotfluoreszierende Substanz mit HJ/Eisessig zu Pyrrolderivaten abbauen. Alle diese Befunde sprachen eindeutig für das Vorliegen von Porphyrin.

Schon von mehreren Autoren ist das Auftreten freier Porphyrine bei verschiedenen Mikroorganismen beschrieben worden. Van Niel (50) beobachtete erstmals diese Verbindung bei mehreren Rhodopseudomonas-Arten. Davies (51) bestimmte den Gehalt an freien Porphyrinen bei R. spheroides zu 95 % Coproporphyrin III und 4 %

Uroporphyrin I und III. Der Rest waren Spuren von Porphyrinen mit 3,5 und 7 Carboxylgruppen. Im Vergleich zur Porphyrinausscheidung bei diesen Photosynthese-Bakterien ist der Betrag an Porphyrinen, die bisher bei anderen Organismen beobachtet wurden, unbedeutend. Auch hier ist jedoch Coproporphyrin III das am häufigsten auftretende Porphyrin. Eine interessante Ausnahme bildet Saccharomyces anamensis, das unter bestimmten Bedingungen größere Mengen des isomeren Coproporphyrins I bildet (52). Nach Slonimski (53) akkumulieren normale und "petite colonie" - Stämme von S.cerevisiae in sehr geringer Menge Coproporphyrine.

Es war von Interesse zu klären, ob die bei Hefemutanten von S.cerevisiae beobachtete Rotfluoreszenz durch ein Gemisch aus mehreren Porphyrinen oder nur von einem bestimmten Vertreter dieser Verbindungsklasse hervorgerufen wird. Nachdem schon im System Lutidin/Wasser, das von Rimington (54) für die Trennung von freien Porphyrinen beschrieben ist, eine Auftrennung der erhaltenen rotfluoreszierenden Phase in mehrere Flecke beobachtet worden war, konnte auch im Gemisch Isopropanol/Ammoncarbonat-Lösung (25 %)/Ammoniak ein Laufsystem gefunden werden, in dem über Dünnschicht auf Kieselgel-G-Platten eine Auftrennung der rotfluoreszierenden Phase erreicht wurde. Allerdings zeigte auch das saure Hydrolysat einer Probe von authentischem Coproporphyrinester III und Coproporphyrinester I eine mehrfache Auftrennung, während bei Hydrolyse mit 2 % methanolischer Kalilauge jeweils nur ein Fleck auftrat und erst nach mehreren Tagen eine Aufspaltung in mehrere rotfluoreszierende Substanzflecke zu beobachten war, die offensichtlich auf eine Zersetzung des ursprünglichen Porphyrins zurückzuführen waren. Das führte zu der Vermutung, daß es sich bei der beobachteten Auftrennung der aus der Kulturflüssigkeit gewonnenen Porphyrinphase nicht um eine

Trennung mehrerer echter Porphyrine handelt, sondern um Zersetzungsprodukte, die im sauren Milieu und unter dem Einfluß von Tageslicht offensichtlich leicht entstehen. Tatsächlich zeigte eine frisch mit Essigester extrahierte Probe der von den Hefen abgeschiedenen Porphyrine auf dem Chromatogramm nur einen Fleck, der sich durch vergleichende Papierchromatographie in Lutidin/Wasser 5 : 2 als Coproporphyrin I erwies. Danach scheiden Hefezellen von Saccharomyces cerevisiae unter den Bedingungen der Akkumulation ebenso wie Saccharomyces anamensis (52) Coproporphyrin I aus.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Hefeporphyrine wurde versucht, das oben angeführte Dünnschichtsystem zu einem allgemein anwendbaren Trennsystem für Porphyrine zu entwickeln. Leider zeigte sich, daß die Uroporphyrine I und III darin praktisch garnicht wandern, während die Coproporphyrine I und III bei der Zusammensetzung Isopropanol/Ammoncarbonat-Lösung (25 %) 2 : 1, gesättigt mit Ammoniak, nur eine schwache Auftrennung ergeben.

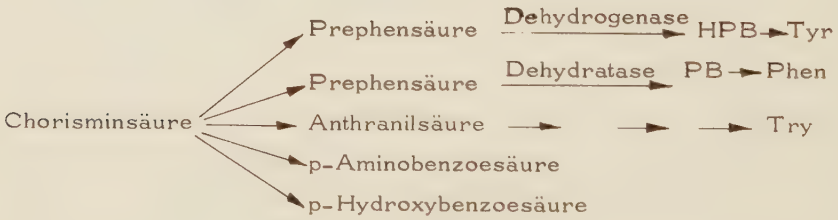
Das Auftreten von freiem Coproporphyrin I hängt von den äußeren Bedingungen im Minimalmedium ab. So konnte in einer Kulturflüssigkeit, die bei p_H 7-8 gehalten wurde, das Auftreten von freiem Porphyrin nicht mehr beobachtet werden. Das Coproporphyrin I tritt auch nicht auf, wenn man unter Belüftung arbeitet. Dies legte den Verdacht nahe, daß eine unmittelbare Beziehung zwischen abgeschiedenem freiem Porphyrin und den Cytochromen besteht, als deren abgewandelte Vorprodukte die Porphyrine angesehen werden können. Tatsächlich ließ sich zeigen, daß unter aeroben Bedingungen, wobei kein freies Porphyrin gebildet wird, der Gehalt an Cytochrom C in der Zelle etwa 12 mal höher ist,

als unter den halb-anaeroben Bedingungen, die zur Ausscheidung von Coproporphyrin I führen.

B. Untersuchungen an biochemischen Mangelmutanten von S.cerevisiae mit genetischem Block hinter der Verzweigungsstelle in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren

Im Zusammenhang mit der Aufklärung der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren in Hefe war es von Interesse, die Akkumulatbildung bei Mutanten mit genetischem Block unmittelbar hinter der Verzweigungsstelle zu untersuchen.

Überträgt man die neuesten Anschauungen von Gibson (14) über den Verlauf der Aromatenbiosynthese, die dieser an Aerobacter aerogenes gewonnen hat, auf Saccharomyces cerevisiae, womit die folgenden Untersuchungen durchgeführt wurden, so lassen sich theoretisch folgende Typen von Mutanten, die unmittelbar hinter der Verzweigungsstelle in der Aromatenbiosynthese blockiert sind, aufstellen:



Typ 1 : Tyrosinmutante, bei der die Mutase T oder der Komplex Mutase T + Dehydrogenase ausgefallen ist.

Typ 2 : Phenylalaninmutante mit defekter Mutase P bzw. defektem Enzymkomplex Mutase P + Dehydratase.

Typ 3 : Tryptophanmutante, der die Anthranilsäure-Synthetase fehlt.

Typ 4 : p-Aminobenzoesäuremutante, mit genetischem Block zwischen Chorisminsäure und p-Aminobenzoesäure bzw.

einem eventuellen Vorprodukt der p-Aminobenzoesäure.

Typ 5 : p-Hydroxybenzoesäuremutante, mit genetischem Block zwischen Chrosminsäure und p-Hydroxybenzoesäure.

Mutanten des Typs 5 konnten bisher noch nicht gefunden werden, dagegen dürften die im folgenden untersuchten auxotrophen Hefemutanten den Typen 1 - 4 entsprechen. Außerdem kam noch eine Tyrosin/Phenylalanin-Mutante zur Untersuchung, die sich wie eine Verzweigungsmutante verhält, deren genetische Blockierung jedoch noch unklar ist.

I Tryptophanmutanten des Typs 3 von S.cerevisiae
E 40, DX 12, HK 78

Die untersuchten Mutanten DX 12, E 40 und HK 78 sind Tryptophanmangelmutanten, die wahlweise mit Tryptophan, Indol oder Anthranilsäure wachsen können, die ihren genetischen Block also vor der Anthranilsäure haben. Um zu den von den Hefemutanten abgegebenen Akkumulaten zu gelangen, wurden die Hefen drei Tage in einem Komplett-Medium vorgezüchtet, anschließend abzentrifugiert, mit einer Salzlösung gewaschen und in ein Minimalmedium gebracht. Nach verschiedenen Akkumulationszeiten, die zwischen 2 Stunden und 3 Tagen lagen, wurde die Kulturflüssigkeit auf Akkumulate untersucht. Während bei einer Mutante, die ihren genetischen Block an einer unverzweigten Stelle der Biosynthese hat, im allgemeinen das Produkt akkumuliert wird, hinter dem die Mutante blockiert ist, stellte sich heraus, daß Mutanten vom Verzweigungstyp stets Gemische mehrerer Substanzen akkumulieren.

Eine papierchromatographische Auftrennung der Akkumulationsprodukte der Tryptophanmutanten ließ sich erfolgreich im System Isopropanol/Ammoniak/Wasser 8 : 1 : 1 durchführen. Auf dem entwickelten Papierchromatogramm ließen sich unter der UV-Lampe (λ_{max} = 254 nm) 5 deutlich getrennte löschende Fiecke in unterschiedlicher Konzentration feststellen, die auch mit geeigneten Sprühreagentien sichtbar gemacht werden konnten:

R_F = 0,2

R_F = 0,25

R_F = 0,35 - 0,4

R_F = 0,6 - 0,7

R_F = 0,9

1. Chorisminsäure

Die Substanz mit dem niedrigsten R_F-Wert tritt in sehr geringer Konzentration auf. Die Menge ist stark abhängig von der Dauer der Akkumulation. Sie ist am höchsten nach ca. 4 Stunden, während nach 3 Tagen praktisch nichts mehr von diesem Produkt zu finden ist. Das spricht für eine große Labilität dieses Akkumulationsproduktes. Das UV-Spektrum besitzt in Wasser als Lösungsmittel ein Maximum bei 273 - 274 nm, das sich weder im sauren noch im alkalischen Milieu merklich ändert. In Methanol als Lösungsmittel liegt das Maximum des UV-Spektrums bei 276 nm, während es in Äther nach 280 - 282 nm verschoben ist. Diese spektroskopischen Daten stimmen gut überein mit den von Gibson (12) für die Chorisminsäure angegebenen. Es wurden daher mit der akkumulierten Substanz mehrere für Chorisminsäure charakteristische Reaktionen durchgeführt:

Die Substanz reagiert mit Diazoniumsalzen, z.B. Echtblausalz B. Kurzzeitiges Erwärmen mit verdünnter Salzsäure führt zur Bildung von p-Hydroxybenzoesäure und wenig Phenylbrenztraubensäure. Zweistündiges Erwärmen bei 80° C mit verdünntem Alkali führt zur Bildung von Prephensäure, die beim Ansäuern in Phenylbrenztraubensäure umgewandelt wird.
Außerdem stimmen die R_F-Werte dieses Akkumulationsproduktes in den Chromatographiesystemen Benzol/Eisessig/Wasser und Butanol/Methanol/Wasser/Benzol mit den von Gibson für die Chorisminsäure angegebenen R_F-Werten gut überein.

2. p-Aminobenzoesäure

Der gleichfalls nur in sehr geringer Konzentration auftretende Fleck bei R_F = 0,25 reagierte bei Besprühen mit Ehrlich's Reagens gelb, was für das Vorliegen eines aromatischen Amins sprach. Das UV-Spektrum (gemessen in Methanol: λ_{max} = 287 nm im neutralen und 266 nm im alkalischen Milieu) stimmte gut mit dem von p-Aminobenzoesäure überein. Vergleichende Papierchromatographie in mehreren Systemen erbrachte den weiteren Beweis für die Identität der Substanz mit p-Aminobenzoesäure.

3. p-Hydroxybenzoesäure

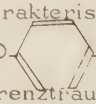
Die Substanz vom R_F-Wert 0,35 - 0,4 wurde als p-Hydroxybenzoesäure identifiziert. Das UV-Spektrum der eluierten Zone erwies sich als identisch mit einer authentischen Probe:

Vergleich der beiden UV-Spektren:

Lösungsmittel	UV-Maximum des Substanzfleckes R_F 0,35	UV-Maximum der p-Hydroxybenzoesäure
Methanol	neutral 250 nm alkalisch 275 - 276 nm	neutral 250 nm alkalisch 276 nm
Cyclohexan + 10 % Äther	282,272 nm	282,272 nm

Außerdem wurde die Identität mit p-Hydroxybenzoesäure durch Mischchromatogramm in mehreren Laufsystemen bewiesen.

4. p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure

Die eluierte Zone beim R_F-Wert 0,7 hatte in Methanol als Lösungsmittel ein UV-Maximum von 283 - 284 nm mit einer langwelligen Verschiebung im Alkalischen nach 330 nm. Diese Erscheinung sprach für das Vorliegen einer freien phenolischen OH-Gruppe. Am besten entsprachen diesen UV-Charakteristica die Spektren von Verbindungen mit der Struktur HO-  -C=C-
Wenn man berücksichtigt, daß p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure im Alkalischen unter Enolisierung in eine derartige Struktur übergeht, lag der Gedanke nahe, diese Substanz zum Vergleich heranzuziehen. Die UV-Maxima (neutral und alkalisch in Methanol) von authentischer p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (HPB) stimmten mit denen des Substanzflecks R_F= 0,7 vollständig überein. Übereinstimmung zeigten auch die R_F-Werte im System Isopropanol/ Ammoniak/Wasser von HPB mit der untersuchten Substanz; ebenso die Reaktionen mit verschiedenen Sprühreagentien.

Reagens	Farbreaktion
Eisen-(III)-chlorid	Schwach gelb, wenig charakteristisch
Alkal. Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung	Schwach rot in der Kälte
Echtblausalz B	rotbraun
o-Phenylendiamin/ Trichloressigsäure	Unter der UV-Lampe hellbraun fluoreszierend

Die Reaktion mit Eisen-(III)-chlorid sprach für eine phenolische oder enolisierbare Verbindung. Alkalische Triphenyltetrazoliumchloridlösung wird von reduzierenden Verbindungen zu rotgefärbten Triphenylformazanen umgewandelt. Die positive Reaktion mit diesem Reagens wies daher auf reduzierende Eigenschaften hin. Echtblausalz B ist eine diazotierte Komponente, die mit kupplungsfähigen Partnern zu Azofarbstoffen reagiert. Die Reaktion mit o-Phenylendiamin/Trichloressigsäure ist charakteristisch für eine α-Ketosäure.

Alle diese Eigenschaften standen mit denen der p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure im Einklang.
Der Schmelzpunkt einer über Papierchromatographie angereicherten Probe des Substanzfleckes R_F= 0,7 lag beträchtlich tiefer (~150°C) als der von authentischer HPB (Fp. 210°C). Das ließ vermuten, daß es sich beim Substanzfleck R_F= 0,7 um ein Gemisch aus mehreren Verbindungen handelt, von denen eine p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure ist.

Gibson (55) hatte bei der Trennung der Phenylbrenztraubensäuren mit Erfolg das System Benzol/Eisessig/Wasser 125:72:3 (56) angewendet. Tatsächlich ließ sich der oben untersuchte Substanzfleck in diesem System in insgesamt 3 Flecke trennen (alle löschend

unter der UV-Lampe 254 nm). Ihre R_F-Werte waren: 0,4 , 0,7 und 0,9. Der Fleck bei R_F= 0,4 erwies sich als identisch mit p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure.

5. p-Hydroxybenzaldehyd

Der Substanzfleck beim R_F-Wert 0,7 - 0,75 im System Benzol/Eisessig/Wasser trat je nach Alter der untersuchten Probe in kleinerer oder größerer Konzentration auf. Das UV-Spektrum ähnelte sehr stark dem der p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (in Methanol neutral 290s, λ_{max} = 285 - 282 nm, alkalisch λ_{max} = 330 nm). Diese Tatsache ließ auf eine ähnliche Struktur dieser Verbindung schließen. Aus älteren Proben konnte diese Substanz in beträchtlichen Mengen gewonnen werden, wenn man das durch Essigesterextraktion gewonnene Substanzgemisch mit Natriumbicarbonat versetzte und anschließend ausätherte. Die Substanz ging dabei mit dem weiter unten beschriebenen Tyrosol in die Ätherphase. Das sprach dafür, daß die Substanz keine Carboxylgruppe besitzt. Aus der p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure entsteht, wie aus der Literatur bekannt war (55), p-Hydroxybenzaldehyd durch Oxydation an der Luft. Gleicher R_F-Wert in verschiedenen Laufsystemen, gleiche UV-Maxima (alkalisch und neutral) sowie das IR-Spektrum, das von einer über Papierchromatographie angereicherten Probe aufgenommen wurde, sprachen eindeutig für die Identität dieser Substanz mit p-Hydroxybenzaldehyd.

6. Phenylbrenztraubensäure

Der oberste Substanzfleck im System Benzol/Eisessig/Wasser (R_F 0,9) erwies sich auf Grund gleicher R_F-Werte in verschiedenen Laufsystemen und gleicher UV-Spektren mit Phenylbrenztraubensäure als identisch. Phenylbrenztraubensäure trat in

wesentlich geringerer Konzentration als p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure auf und war am Papierchromatogramm oftmals kaum zu finden.

7. p-Hydroxyphenyläthanol (Tyrosol)

Die Substanz mit dem höchsten R_F-Wert besitzt ein UV-Spektrum (gemessen in Methanol: neutral λ_{max} = 276 - 277 nm, alkalisch λ_{max} = 292 und 241 nm), das dieselben charakteristischen UV-Eigenschaften besitzt wie Phenol und p-Hydroxyphenylalkyl-Verbindungen. Sie zeigt keine Carboxylfunktionen und reagiert mit Sprühreagentien, die für phenolische Substanzen charakteristisch sind (Echtblausalz B, diazotierte Sulfanilsäure). Über Papierchromatographie wurde dieses Produkt, das in relativ großer Menge auftritt, soweit angereichert, daß man ein IR-Spektrum und ein Massenspektrum anfertigen konnte. Während das IR-Spektrum keine neuen Hinweise auf die Struktur der Substanz erbrachte, lieferte das Massenspektrum folgende Befunde (Abb. 1):

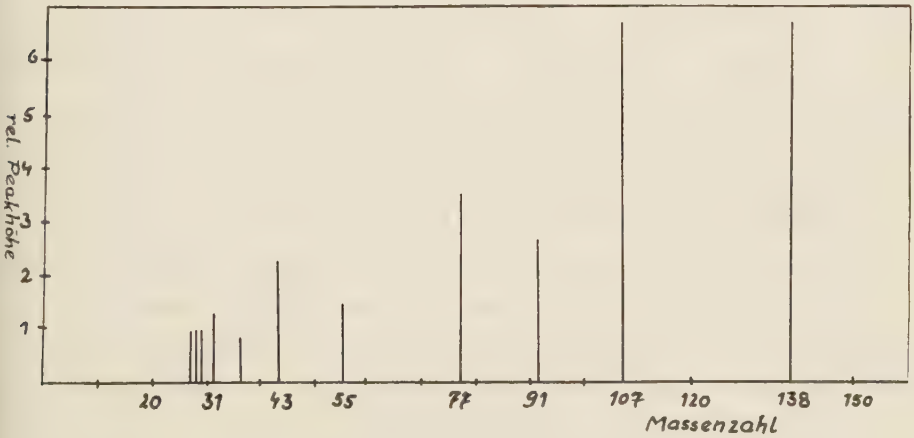
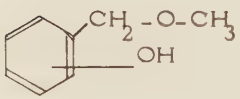
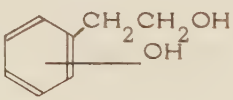


Abb. 1 : Massenspektrum von Tyrosol

Das Molgewicht der Substanz beträgt 138. Die Massenzahl 107 entspricht dem Hydroxytropylium-kation. Dazu muß am Aromaten eine Hydroxylgruppe und mindestens ein C-Atom stehen. Daneben treten die Massenzahlen 77 (Phenylkation) und 91 (Tropylium- bzw. Benzylkation) auf. Das Hydroxytropylium-kation ist extrem stabil. Es stellt auch beim Zerfall des Tyrosins die Hauptmassenzahl dar. Die Massendifferenz 138 - 107 = 31 entspricht der Abspaltung einer Methoxy-Gruppe. Es kann jedoch keine Methoxygruppe am Aromaten sein, denn hier findet man Abspaltung von CH_3, d.h. eine Massenzahl von 15 . Nach dem Massenspektrum wären folgende zwei Strukturen zu diskutieren:



I



II

Über die Stellung der OH-Gruppe kann man kaum etwas sagen, aber o- oder p-Stellung ist wahrscheinlicher als meta, weil erstere die Bildung des Hydroxytropylium-kations begünstigen würden.

Die Struktur II mit der Hydroxylgruppe in p-Stellung konnte durch Reduktion von p-Hydroxyphenylessigsäure mit $LiAlH_4$ synthetisiert werden. Das IR-Spektrum des synthetisierten p-Hydroxyphenyläthanols (Tyrosol) stimmte exakt mit dem des akkumulierten Produktes überein.

II Tyrosinmutanten des Typs I von S.cerevisiae
HK 99 und AC 39

Das hier auftretende Akkumulatgemisch wurde in ähnlicher Weise gewonnen und chromatographisch getrennt wie bei den beschriebenen Tryptophanmutanten. Bewährt hat sich außerdem bei dieser Auftrennung das Dünnschichtsystem Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5. An schon bekannten Produkten ließen sich nachweisen:

Chorisminsäure, p-Aminobenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure und Phenylbrenztraubensäure.
Daneben treten im System Isopropanol/Ammoniak/Wasser bei R_F = 0,9 und R_F = 0,95 zwei neue Substanzen auf.

1. Phenyläthanol

Während diese Verbindung bei der Mutante HK 99 nicht gefunden werden konnte, tritt sie bei der Mutante AC 39 in relativ großer Menge auf. Das sehr bandenreiche UV-Spektrum der Substanz (in Methanol als Lösungsmittel liegen die Maxima der Substanz bei 267,5 nm, 263 nm, 253 nm, 247 nm), das dem UV-Spektrum des Benzols ähnelt, ließ vermuten, daß es sich bei der Substanz um ein Alkylbenzol handelt. Die Verbindung war vollkommen identisch mit dem durch Abbau von Phenylalanin durch Hefewildstamm (siehe später) gewonnenen Phenyläthanol.

2. Tryptophol

Die Verbindung beim R_F-Wert 0,95 reagiert mit Ehrlich's-Reagens zunächst unter Gelbfärbung. Der Farbton wandelt sich aber rasch in blau-violett um. Das UV-Spektrum zeigt charakteristische Maxir

bei 290 nm, 283 nm, 274 nm (s) und 224 nm, die ebenso wie die Reaktion mit Ehrlich's-Reagens für das Vorliegen eines Indolderivates sprechen. Das IR-Spektrum und Chromatographie in verschiedenen Systemen mit authentischem Tryptophol erbrachten den Beweis für das Vorliegen dieser Substanz. Eine Auftrennung auf Kieselgel G im erwähnten System Chloroform/Methanol/Eisessig ergab, daß sich dieser Fleck weiter auftrennen läßt und neben Tryptophol noch eine Reihe anderer Indolderivate in geringer Konzentration auftreten, die sich, wie später gezeigt werden soll, alle vom L-Tryptophan ableiten.

III Phenylalaninmutante des Typs 2 von S.cerevisiae HK II

Im Medium dieser Mutante ließen sich nachweisen:
Geringe Mengen an Chorisminsäure, p-Hydroxybenzoesäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, wenig Phenylbrenztraubensäure, Tyrosol und Tryptophol.
Diese Phenylalaninmutante zeigt auch ohne Zugabe von Phenylalanin langsames Wachstum, da die akkumulierte Chorisminsäure unter den p_H-Bedingungen des Mediums über Prephensäure in Phenylbrenztraubensäure umgewandelt werden kann und so der genetische Block überwunden wird. Die Mutante bildet deshalb auch wenig Akkumulat, so daß p-Aminobenzoesäure nicht gefunden wurde, deren Auftreten zu fordern wäre. Die im Medium dieser Mutante gefundene geringe Menge an Phenylbrenztraubensäure dürfte ebenfalls nur durch Zerfall der akkumulierten Chorisminsäure entstanden sein.

IV p-Aminobenzoesäuremutante des Typs 4 von Schizosaccharomyces pombe - 4//2a

Zur Untersuchung der Verhältnisse bei einer p-Aminobenzoesäuremutante von Hefe stand nur eine Schizosaccharomyces pombe-Mutante zur Verfügung, die sich bei der Akkumulatbildung analog wie die bereits beschriebenen S.cerevisiae-Mutanten verhielt. Wie bei allen Vitaminmutanten waren die Mengen an akkumulierten Produkten äußerst gering und daher nur schwer nachzuweisen. Wahrscheinlich konnte deshalb auch keine Chorisminsäure gefunden werden, sondern nur p-Hydroxybenzoesäure, vermutlich Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Tyrosol und Tryptophol.

V Phenylalanin/Tyrosin-Mutanten von S.cerevisiae
E 104, HK 37 und Kp 171

Diese Mutanten sind auf die gleichzeitige Zufuhr von Phenylalanin und Tyrosin angewiesen. Da dieser Typ von Mutanten relativ häufig bei der Auslösung von Mutationen auftritt, waren wir bisher der Ansicht, daß diese Mutanten einen einzigen genetischen Block im Umwandlungsschritt Chorisminsäure → Prephensäure besitzt. Nach den eingangs gemachten Ausführungen, die sich auf die neuen Arbeiten von Gibson stützen, ist eine derartige Annahme nicht mehr gerechtfertigt. Liegen die Verhältnisse bei Hefe analog wie bei A.aerogenes, so muß man annehmen, daß es sich bei diesem Mutantentyp um echte Doppelmutanten handelt, bei denen die beiden Chorismatmutasen P und T ausgefallen sind. In ihren Akkumulationsprodukten verhalten sich diese Mutanten entsprechend wie die anderen bisher beschriebenen Verzweigungsmutanten. Sie bilden ein Gemisch

aus relativ viel Chorisminsäure, p-Aminobenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure, etwas Phenylbrenztraubensäure - wahrscheinlich durch den Zerfall der Chorisminsäure - geringe Mengen Anthranilsäure, viel Tryptophol und weitere Abbauprodukte des L-Tryptophans. Die Menge der gebildeten Substanzen ist bei den drei Mutanten dieses Typs sehr unterschiedlich. So bildet die HK 37 so wenig Akkumulat, daß die einzelnen Verbindungen kaum nachzuweisen sind, während die Kp 171 große Mengen der beschriebenen Produkte liefert. Die Mutante E 107 liegt in ihrer Leistung etwa dazwischen.

Die Ergebnisse, die an den beschriebenen fünf Typen von Verzweigungsmutanten gewonnen wurden, sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3) nochmals zusammengefaßt. Die Mengenverhältnisse sind durch die Anzahl der Kreuze grob charakterisiert.

Tabelle 3:

Substanz	Try⁻ E 40, DX 12 HK 78	Phen⁻ HK 11	Tyr⁻ HK 99 AC 39	Phen⁻/Tyr⁻ E 104, Kp 171 HK 37	Pab⁻ 4//2a
Phenylbrenztraubens.	+	(+)	++	+	(+)
Phenyläthanol	-	-	+	-	-
p-Hydroxyphenylbrenztraubens.	++	+	-	-	+
Tyrosol	+ + +	+ +	-	-	+ +
Anthranils.	-	-	(+)	+	-
Tryptophol	-	+ +	+ +	+ + +	+
Chorismins.	+	(+)	+	+ +	-

Fortsetzung von Tab. 3

Substanz	Try⁻ E 40, DX 12 HK 78	Phen⁻ HK 11	Tyr⁻ HK 99 AC 39	Phen⁻/Tyr⁻ E 104, Kp 171 HK 37	Pab⁻ 4//2a
p-Aminobenzoesäure	+	(+)	+	+	-
p-Hydroxybenzoesäure	+ +	+	+ +	+ +	+

Wenn man diese Ergebnisse mit der Darstellung der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren vergleicht, so erkennt man, daß die Gemische bei der Akkumulatbildung durch Ausweichreaktionen in die anderen nicht blockierten Richtungen der verzweigten Synthesekette zustande kommen. So liefert die Tryptophanmutante Produkte aus dem Tyrosin-, dem Phenylalanin-, dem p-Aminobenzoesäure- und dem p-Hydroxybenzoesäurezweig. Dieser Gesetzmäßigkeit folgen auch die übrigen Mutanten, die jeweils Produkte aus den nicht-blockierten Zweigen liefern. Dieses Ergebnis kam sehr überraschend, denn nach den Vorstellungen der Regulation wäre bei jeder dieser Verzweigungsmutanten Chorisminsäure als einziges Akkumulat zu erwarten gewesen, während diese Säure, wie gezeigt wurde, fast ausschließlich nur in sehr geringer Menge auftrat.

VI Die Akkumulatbildung bei der Tryptophanmutante HK 167 von S.cerevisiae

Die Tryptophanmangelmutante HK 167 läßt sich in keine der beschriebenen Gruppen von Verzweigungsmutanten einordnen. Sie ist nicht mit Anthranilsäure sondern nur mit Indol zum Wachsen zu bringen. Andererseits ist diese Mutante aber nicht in der Lage,

Anthranilsäure $^-$ - Mutanten zu füttern. Es wird vermutet, daß bei dieser Mutante alle Gene für die Enzyme, welche die Reaktionsschritte von der Chorisminsäure bis zum Indol katalysieren, inaktiv geworden sind. In ihren Akkumulationsprodukten verhält sie sich wie eine Verzweigungsmutante. Neben sehr wenig Anthranilsäure, lassen sich größere Mengen an p-Hydroxybenzoesäure, Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und Tyrosol nachweisen.

VII Das Problem der 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure bei Hefe

Interessanterweise hatten F. Gibson und Mitarbeiter (57) bei einer Tryptophanmangelmutante von A.aerogenes mit genetischem Block vor der Anthranilsäure eine Reihe phenolischer Verbindungen als Akkumulate nachweisen können. Diese Autoren fanden ein Gemisch aus 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und einer nicht identifizierten Aminophenolcarbonsäure. Bei dieser Mutante wurden aber keine Ausweichprodukte nachgewiesen, wie sie bei den oben beschriebenen Hefemangelmutanten immer beobachtet wurden. Doy und Gibson (58) stellten die zusätzliche Akkumulation von p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und Phenylbrenztraubensäure bei Tryptophanmangelmutanten und Wildstamm von A.aerogenes fest, wenn sie die Zellen unter Stickstoffmangelbedingungen hielten. Diese Autoren nehmen an, daß die Zwischenprodukte der Biosynthese des Phenylalanins und Tyrosins auf Grund der Stickstoffmangelbedingungen angehäuft werden. Die Bildung von 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und Brenzkatechin soll mit der Bildung des letzten Stickstoff-freien Vorproduktes in der Biosynthese der Anthranilsäure zusammenhängen (59).

Trotz intensiver Suche konnte bei den oben beschriebenen Hefemangelmutanten die erwähnten Phenolcarbonsäuren nicht nachgewiesen werden. Da man vermuten konnte, daß diese Verbindungen zunächst zwar gebildet werden, später aber abgebaut würden, wurde dem Medium geeigneter Hefemutanten und einem Hefewildstamm (S 288c) 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure zugesetzt. Die im Medium vorhandene Menge dieser Dihydroxybenzoesäuren wurde über mehrere Tage UV-spektroskopisch verfolgt. Es zeigte sich, daß keine Abnahme auftrat. Die Säuren wurden nicht abgebaut, und es ließen sich auch keine Umwandlungsprodukte wie Brenzkatechin u.a. nachweisen.

VIII Akkumulatbildung bei Tryptophanmangelmutanten von Bakterien mit genetischem Block zwischen Chorisminsäure und Anthranilsäure

Da F. Gibson (57) im ausreichend mit Stickstoff versorgten Medium einer Tryptophanmangelmutante von A. aerogenes nur phenolische Substanzen nachweisen konnte, während nach den obigen Ausführungen bei entsprechenden Hefemangelmutanten nur Akkumulate im Sinne von Ausweichreaktionen gefunden wurden, war es von Interesse, die Frage zu klären, ob grundsätzliche Unterschiede bei Verzweigungsmutanten von Bakterien und Hefen auftreten. Es wurden deshalb drei Tryptophanmangelmutanten von Escherichia coli und eine von Salmonella typhimurium mit genetischem Block vor der Anthranilsäure auf ihre Akkumulationsprodukte untersucht. Es zeigte sich, daß alle Mutanten das gleiche Gemisch akkumulieren, An schon bekannten Produkten konnte nachgewiesen werden: Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, p-Hydroxybenzoesäure und p-Aminobenzoesäure. Daneben traten

auf einem in Isopropanol/Ammoniak/Wasser entwickelten Papierchromatogramm zwei neue Substanzflecke auf:
ein unter der UV-Lampe blau fluoreszierender Fleck bei R_F= 0,3 und ein löschender Fleck bei R_F= 0,5 - 0,6.
Die blaufluoreszierende Substanz ließ sich auf Grund übereinstimmender R_F-Werte in verschiedenen Laufsystemen mit authentischer 2,3-Dihydroxybenzoesäure sowie ihres charakteristischen UV-Spektrums als 2,3-Dihydroxybenzoesäure identifizieren. Der andere Substanzfleck konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden. Nach dem UV-Spektrum und den Reaktionen (positiv mit Bromkresolpurpur auf Säure, schwach positiv mit Echtblausalz B auf phenolische Substanzen) dürfte es sich dabei um p-Hydroxyphenylmilchsäure oder p-Hydroxyphenylessigsäure handeln. Jedenfalls stellte diese Substanz ein Abbauprodukt des Tyrosins dar, denn es konnte gezeigt werden, daß ein Bakterienwildstamm dem größere Mengen Tyrosin zugesetzt wurden, diese Substanz liefert.

Nach diesen Befunden besteht der Unterschied in den Akkumulationsprodukten bei Verzweigungsmutanten von S.cerevisiae einerseits und E.coli und S.typhimurium andererseits darin, daß - abgesehen von den Abbauprodukten der Endaminosäuren - bei S.cerevisiae die 2,3-Dihydroxybenzoesäure nicht auftritt. Außer von Gibson ist die 2,3-Dihydroxyberzoesäure inzwischen bei verschiedenen Mikroorganismen aufgefunden worden, und wahrscheinlich kommen mehrere Biosynthesewege für die Verbindung in Betracht. So konnte sie in Claviceps paspali (60) nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, daß diese Verbindung entweder aus 3-Hydroxyanthranilsäure gebildet wird - ein Weg der für die meisten Bakterien nicht in Betracht gezogen werden muß, da sie keine 3-Hydroxyanthranilsäure synthetisieren - oder daß Salicylsäure das Ausgangsmaterial darstellt. In Bacillus subtilis ist die 2,3-Dihydroxybenzoe-

säure als Glycinkonjugat isoliert worden (61). Auch in Aspergillus niger wurde die 2,3-Dihydroxybenzoesäure gefunden (62). Der Streptomycin-Bildner Streptomyces griseus liefert diese Verbindung unter Eisenmangelbedingungen.

IX Über den Einfluß bestimmter Hemmstoffe auf die Akkumulatbildung bei Verzweigungsmutanten von Hefe und Bakterien

Das Endprodukt einer Biosynthesekette wirkt regulierend auf den Ablauf der Synthese. Man kennt heute zwei solcher Regulationsmechanismen.

1. Die Kontrolle der Enzymsynthese durch Repression oder Induktion durch das Endprodukt (64,65)
2. Die Kontrolle der Enzymaktivität durch das Endprodukt (Feed back oder Rückkopplung).

Für die folgende Betrachtung ist vor allem der 2. Regulationsmechanismus von Bedeutung. Das Endprodukt einer Biosynthesekette wirkt hemmend vor allem auf die Aktivität des Enzyms, das den ersten Reaktionsschritt katalysiert (3,66). Wie bei mehreren verzweigten Biosynthesekette inzwischen gezeigt werden konnte, entfaltet das Endprodukt auch noch eine besonders starke Hemmung auf die Aktivität des Enzyms nach einer Verzweigung (13, 14, 67). Die Aktivität der übrigen Enzyme der Reaktionskette wird dagegen nur wenig beeinflußt. Den Feedback-Mechanismus können jedoch nicht nur die eigentlichen Endprodukte der Synthesekette auslösen sondern auch analoge Verbindungen. So wirken in der Tryptophanbiosynthesekette 4-Methyltryptophan, 5-Methyltryptophan und 6-Methyltryptophan stärker hemmend als das Tryptophan selbst (68,69,70). Ähnliches fanden Gots und Gollub bei den Purinanalogen in der

Purinbiosynthese (71) und Moyed in der Histidinbiosynthese (72). Für die Phenylalaninbiosynthese ist p-Fluorphenylalanin als wirksamer Hemmstoff beschrieben worden (73).

Wir haben gesehen, daß bei den Verzweigungsmutanten die Akkumulatbildung durch Ausweichreaktionen in die nichtblockierten Zweige der Aromatenbiosynthesekette zustande kommt. Nach dem beschriebenen Feedback-Mechanismus war dieser Befund höchst überraschend, denn die gebildeten Endprodukte hätten die genetisch nichtblockierten Zweige der Aromatenbiosynthese durch Hemmung der Enzymaktivitäten nach der Chorisminsäure abriegeln sollen. Nun können aber die gebildeten Endaminosäuren, wie später gezeigt werden soll, sowohl von Hefen wie auch von Bakterien abgebaut werden. Auch das Auftreten von Tyrosol, Phenyläthanol und Tryptophol bei den entsprechenden Hefemangelmutanten und von p-Hydroxyphenylmilchsäure bei den Bakterienmutanten deutet auf den Abbau der Aminosäuren hin. Man kann annehmen, daß diese Abbauprodukte nicht mehr in der Lage sind, einen Rückkopplungseffekt zu entfalten. Es wurden deshalb Versuche unternommen, durch Zusatz von Aminosäureanalogen einen entsprechenden Effekt zu erreichen. Mit dem zellfreien Extrakt einer S.cerevisiae-Mutante (E 107), die den Reaktionsschritt Chorisminsäure → Anthranilsäure noch ausführen kann, wurde die Umwandlung Shikimisäure → Anthranilsäure unter Zusatz von je 40 γ/ml 4-, 5- und 6-Methyltryptophan studiert. Dabei zeigte sich, daß 4-Methyltryptophan für die Hefe der wirksamste Feedback-Stoff in der Tryptophanbiosynthese ist, während 5-Methyltryptophan am wenigsten wirksam war. Dieselbe Reihenfolge wurde bei dieser Mutante auch an intakten Zellen gefunden. Die geeignetste Verzweigungsmutante für 4-Methyltryptophan war die Phenylalanin/Tyrosin-Mutante (E 104), bei der die Akkumulate in der Hauptsache durch Ausweichreaktion in den Tryptophanzweig zu-

stande kommen. Setzt man dieser Mutante 4-Methyl-DL-tryptophan zu, so treten zwar immer noch p-Hydroxybenzoesäure und Tryptophol auf, es werden aber wesentlich größere Mengen an Chorisminsäure und Phenylbrenztraubensäure (durch Zerfall der Chorisminsäure) gebildet. Das Verhältnis von p-Hydroxybenzoesäure zu Chorisminsäure, gemessen an den Extinktionen der UV-Maxima bei 250 nm (p-Hydroxybenzoesäure) und 274 nm (Chorisminsäure) ist ohne Zusatz von 4-Methyltryptophan $E_{274}/E_{250} = 0,9$ und mit Zusatz von 50 γ/ml 4-Methyl-DL-tryptophan $E_{274}/E_{250} = 1,74$. L-Tryptophan wirkt dagegen praktisch gar nicht ($E_{274}/E_{250} = 0,94$). Es treten lediglich große Mengen an Tryptophol und anderen Abbauprodukten des L-Tryptophansauf. Das 4-Methyltryptophan wirkt demnach hemmend auf den Tryptophan-Biosyntheseweg und führt so zur erhöhten Akkumulation von Chorisminsäure.

Während bei einer Tryptophan-Verzweigungsmutante (E 40) Zusätze von L-Tyrosin und L-Phenylalanin nur zu erhöhten Mengen an Abbauprodukten dieser beiden Aminosäuren führen, läßt sich durch Zusatz von p-Fluorphenylalanin auch hier ein spezifischer Hemmeffekt erzielen. Durch Gaben von 40 γ/ml DL-p-Fluorphenylalanin wird das Akkumulatgemisch der Mutante E 40 so verändert, daß neben p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Tyrosol, Phenylbrenztraubensäure und p-Hydroxybenzoesäure größere Mengen an Chorisminsäure gefunden werden. Außerdem lassen sich Abbauprodukte des p-Fluorphenylalanins nachweisen (siehe später). Da die Mutante E 40 nach Kurzzeitakkumulation auch ohne Zusatz von p-Fluorphenylalanin etwas Chorisminsäure liefert, wurde auch hier je ein Ansatz unter gleichen Bedingungen mit und ohne p-Fluorphenylalanin untersucht und die Relation Chorisminsäure/p-Hydroxybenzoesäure quantitativ über UV-Spektroskopie gemessen. Dabei ergab sich ohne Zusatz von p-Fluorphenylalanin ein Extinktionsver-

hältnis E_{274}/E_{250} = 0,9 und mit Zusatz von 40 γ/ml DL-p-Fluorphenylalanin ein Extinktionsverhältnis von 1,3, was einer relativen Konzentrationserhöhung von Chorisminsäure entspricht. Die Tyrosinmutante HK 99 liefert unter Zusatz von p-Fluorphenylalanin Phenylbrenztraubensäure, Tryptophol, p-Hydroxybenzoesäure und in größerer Menge Chorisminsäure sowie Abbauprodukte des p-Fluorphenylalanins. Dagegen zeigte die Phenylalaninmutante HK II in Gegenwart von p-Fluorphenylalanin keine wesentliche Veränderung ihres Akkumulatgemisches. Vor allem trat keine Erhöhung der Chorisminsäurekonzentration auf. Auch bei der Tryptophanmutante try-8 von S.typhimurium ließ sich mit p-Fluorphenylalanin ein positiver Effekt erzielen. Während ohne Zusatz keine Chorisminsäure gefunden werden konnte, wurden bei Zusatz von 40 γ/ml DL-p-Fluorphenylalanin geringe Mengen dieses Verzweigungsproduktes nachgewiesen.

Da p-Fluorphenylalanin eine spezifische Hemmwirkung auf die Phenylalanin-Biosynthese ausübt, wurde als möglicher Antagonist für Tyrosin m-Fluortyrosin eingesetzt. Nach Boyer, Evans und Philips soll m-Fluortyrosin bei Ratten als Antagonist für Tyrosin wirken (74). Diese Verbindung wurde in Gaben von 40 - 100 γ/ml bei einer Tryptophanmangelmutante (E 40) und einer Phenylalaninmutante (HK II) eingesetzt. Als Maß für eine spezifische Hemmwirkung wurde das Verhältnis Chorisminsäure/p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure UV-spektroskopisch bestimmt. Für p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure wurde die Extinktion des im Alkalischen bei 328 - 330 nm gelegenen Maximums herangezogen, während für die Chorisminsäure wiederum die Extinktion des Maximums bei 274 nm als Maß diente. Bei der Phenylalaninmutante war das Extinktionsverhältnis ohne Zusatz von m-Fluortyrosin E_{274}/E_{330} = 0,36, während es mit Zusatz von 100 γ/ml DL-m-Fluortyrosin bei 0,38 lag. Die Tryptophanmutante E 40 zeigte ohne Zusatz ein Extink-

tionsverhältnis E_{274}/E_{330} = 0,73 und mit 100 γ/ml DL-m-Fluortyrosin E_{274}/E_{330} = 0,68, während gleichzeitiger Zusatz von 50 γ/ml DL-p-Fluorphenylalanin das Verhältnis auf 1,25 steigerte. Das zeigt deutlich, daß m-Fluortyrosin im Gegensatz zu p-Fluorphenylalanin bei Hefe keinen spezifischen Hemmeffekt auf die Tyrosin-Biosynthese ausübt.

X Umwandlung von Zwischenprodukten und Endprodukten der Aromatenbiosynthese durch Hefewildstamm und Bakterienwildstamm

Wie Ratledge (75) vor kurzem mitteilte, sind Mycobacterium smegmatis und Aerobacter aerogenes in der Lage, Shikimisäure, die bekanntlich ein Zwischenprodukt der Aromatenbiosynthese darstellt, in bestimmte aromatische Verbindungen umzuwandeln, wobei die bereits diskutierten Dihydroxybenzoesäuren wiederum eine große Rolle spielen. Mycobacterien bilden unter Eisenmangelbedingungen Salicylsäure. Diese Verbindung scheint im Zusammenhang mit der Aromatenbiosynthese zu stehen, denn unter Zusatz von Shikimisäure liefert Mycobacterium smegmatis unter Eisenmangelbedingungen Salicylsäure, Anthranilsäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure und p-Hydroxyphenylessigsäure. Aerobacter aerogenes-Wildstamm wandelt die Shikimisäure in Anthranilsäure und p-Hydroxybenzoesäure um. Unter Eisenmangelbedingungen wird hier zusätzlich 2,3-Dihydroxybenzoesäure gebildet.
3,4-Dihydroxybenzoesäure, Anthranilsäure und ein unbekanntes Anthranilsäurederivat treten als Umwandlungsprodukte der Shikimisäure bei einer Tryptophanmutante von Aerobacter aerogenes mit genetischem Block hinter der Anthranilsäure auf. Die Akkumulation

der phenolischen Carbonsäuren veranlaßte uns, diese Bedingungen auch bei Hefewildstamm anzuwenden. Während der Hefewildstamm S 288c beim Wachsen auf Minimalmedium nur ganz geringe Mengen Anthranilsäure abscheidet, lassen sich bei Zusatz von Shikimisäure zum Minimalmedium nach Ablauf der Wachstumsphase mehrere aromatische Produkte nachweisen. Aus einem Medium, dem 30 γ/ml Shikimisäure zugefügt waren, konnten nach 2 Tagen p-Hydroxybenzoesäure, Anthranilsäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und relativ viel Tyrosol isoliert und nachgewiesen werden. Aus einem Ansatz, dem 60 γ/ml Shikimisäure und außerdem 50 γ/ml Glutamin zugesetzt waren, konnten nach 4-tägiger Wachstumsdauer sogar relativ viel Chorisminsäure neben p-Hydroxybenzoesäure, etwas Anthranilsäure, Phenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und Tyrosol erhalten werden. Bemerkenswert ist ein Ansatz, der ebenfalls Shikimisäure und Glutamin enthielt, und beim Stehen mit einem unbekannten Mikroorganismus infiziert wurde. Aus dieser Kulturflüssigkeit ließen sich unter anderem große Mengen an 3,4-Dihydroxybenzoesäure isolieren.

Ein Wildstamm von Escherichia coli (Str. 15) wandelt unter den Bedingungen die Shikimisäure in 4 Tagen zu 3,4-Dihydroxybenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure, p-Hydroxyphenylmilchsäure und wenig 2,3-Dihydroxybenzoesäure um. Der Nachweis von p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure ist fraglich.

Die angewendeten Bedingungen sind demnach für das Auftreten der Dihydroxybenzoesäuren durchaus geeignet. Während beim E.coli-Wildstamm neben 2,3-Dihydroxybenzoesäure auch 3,4-Dihydroxybenzoesäure gefunden wurde, die als Akkumulat bei keiner der untersuchten Bakterienmutanten auftrat, konnten beim Hefewildstamm auch unter diesen Bedingungen weder die 2,3-Dihydroxybenzoesäure

noch die 3,4-Dihydroxybenzoesäure nachgewiesen werden. Die hierbei entstandenen Umwandlungsprodukte lassen sich wieder im Sinne von Ausweichprodukten in die 5 Aromatenbiosynthesezweige erklären.
Das Auftreten von Tyrosol, Phenyläthanol und Tryptophol bei verschiedenen Hefemangelmutanten ließ die Untersuchung des genauen Ablaufs der Abbaureaktionen der aromatischen Aminosäuren interessant erscheinen. Gleichzeitig galt die Frage zu klären, ob die spezifische Hemmwirkung von 4-Methyltryptophan und p-Fluorphenylalanin darauf beruht, daß diese Aminosäureanalogen nicht mehr von der Hefe abgebaut werden können.

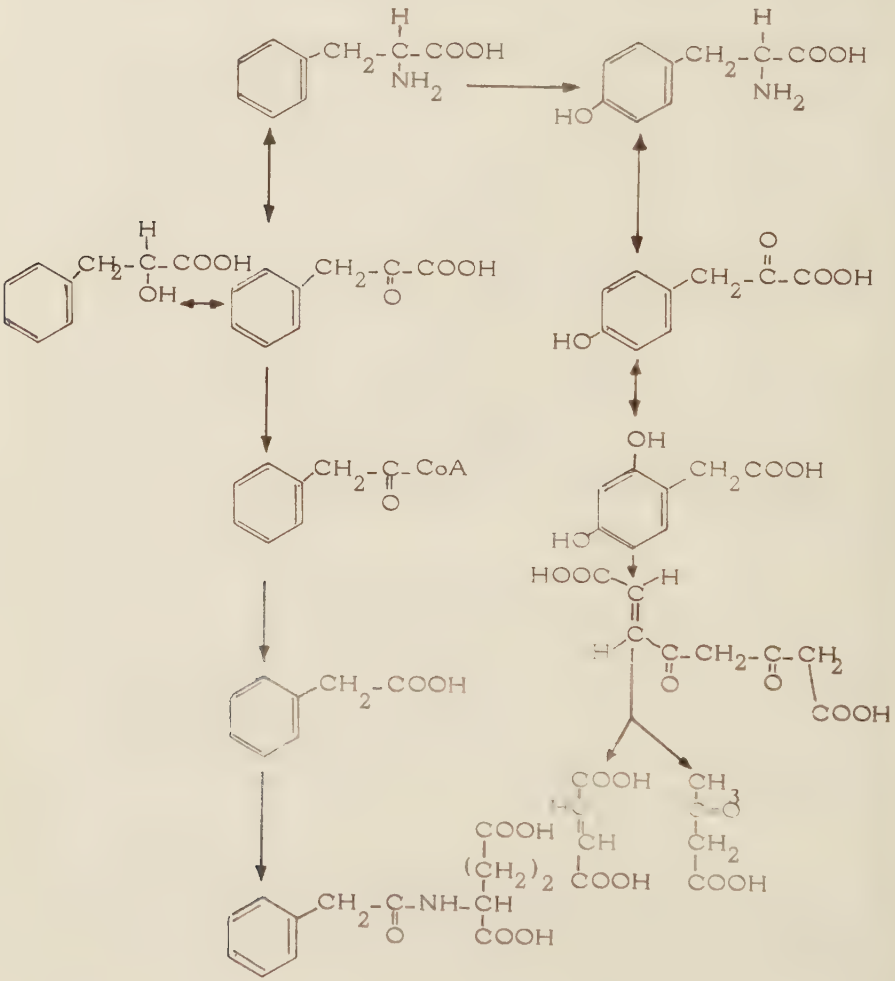
Der Abbau der aromatischen Aminosäuren wurde bereits mehrfach bei verschiedenen Organismen untersucht. Schon F. Ehrlich (76) fand, daß Hefen die aromatischen Aminosäuren zu den Alkoholen Tryptophol, Tyrosol (p-Hydroxyphenyläthanol) und Phenyläthanol abbauen.

Escherichia coli wandelt das Tryptophan mit Hilfe der Tryptophanase in Indol, Brenztraubensäure und Ammoniak um (77), während bei Clostridium sporogenes Indolylpropionsäure als Tryptophanabbauprodukt gefunden werden konnte (78). Kögl und Kostermanns (97) wiesen Indolylessigsäure als Metaboliten beim Abbau des Tryptophans durch aerobe Pilze nach.

Als Umwandlungsprodukte des Tyrosins konnten bei verschiedenen Mikroorganismen (E.coli, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis) p-Hydroxyphenylmilchsäure, p-Hydroxyphenylessigsäure und p-Hydroxyphenylacrylsäure gefunden werden (98).

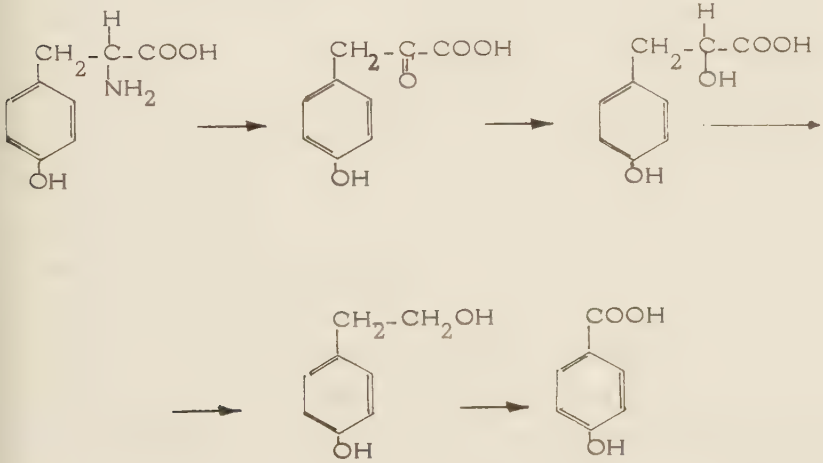
Der Abbau von Phenylalanin und Tyrosin ist besonders eingehend beim tierischen und menschlichen Organismus untersucht worden.

Danach verläuft der Abbau dieser beiden wichtigen Aminosäuren nach folgendem Reaktionsschema (99) :



Zur Untersuchung kamen die drei aromatischen Aminosäuren sowie die Aminosäureanalogen 4-Methyltryptophan und p-Fluorphenylalanin. Der Abbau wurde so durchgeführt, daß Hefewildstamm S 288c frisch vorgezüchtet und nach Abzentrifugieren und Auswaschen der Hefezellen jeweils ca. 5 g Hefe mit 50 γ/ml abzubauender Aminosäure im Minimalmedium inkubiert wurde. Die Abbauzeiten betrugen 1 - 3 Tage.

Tyrosin: Beim Tyrosin ließen sich neben großen Mengen an gebildetem Tyrosol folgende Zwischenstufen isolieren und nachweisen: p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, p-Hydroxyphenylmilchsäure und p-Hydroxybenzoesäure. Der Abbau des Tyrosins verläuft demnach nach folgendem Reaktionsschema:



Der letzte der angeschriebenen Reaktionsschritte wird allerdings nur in ganz geringem Ausmaß beschritten, denn das Tyrosol stellt bei weitem die Hauptmenge der gebildeten Abbauprodukte dar.

Phenylalanin: Einem analogen Abbaumechanismus scheint auch das Phenylalanin zu folgen. In großen Mengen ließ sich hierbei

Phenyläthanol als Abbauprodukt isolieren, während die postulierten Zwischenprodukte, Phenylbrenztraubensäure und Phenylmilchsäure, nicht gefaßt werden konnten. Dagegen scheint auch beim Phenylalanin in geringem Maße der Abbau über das Phenyläthanol hinauszugehen, denn es ließen sich zwei hydroxylierte Produkte in geringer Menge nachweisen, von denen das eine als p-Hydroxybenzoesäure identifiziert werden konnte.

Tryptophan: Während in dem üblichen Papierchromatographiesystem sich nur Tryptophol als Abbauprodukt des Tryptophans in großer Menge zu erkennen gibt, läßt sich mit Hilfe der für die Auftrennung von Indolderivaten hervorragend geeigneten Dünnschichtsystemen Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 und Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Methanol 50:25:25 (79) dieser Substanzfleck weiter auftrennen. Dabei zeigte sich, daß je nach Dauer der Abbauzeit neben Tryptophol noch 3 - 4 weitere Indolverbindungen in unterschiedlicher jedoch geringer Menge aus dem L-Tryptophan gebildet werden. Diese Abbauprodukte des L-Tryptophans mit Tryptophol als Hauptkomponente treten auch bei allen Verzweigungsmutanten auf, die im Tryptophanzweig nicht blockiert sind.
Das überraschendste Ergebnis bei der Untersuchung über den Abbau von Tryptophan war, daß D-Tryptophan zumindest quantitativ völlig anders abgebaut wird als L-Tryptophan. Während im Falle von L-Tryptophan in allen Ansätzen Tryptophol Hauptprodukt des Abbaues war, trat diese Substanz beim Abbau von D-Tryptophan nur in relativ geringer Menge auf. Das Hauptprodukt war hier eine Substanz, die nach ihren Eigenschaften der Indolylmilchsäure entsprechen könnte. Mit Bromkresolpurpur reagierte sie sauer. Das IR-Spektrum dieser Verbindung zeigt eine Carbonylbande bei 5,9. Das UV-Spektrum entspricht dem von Indol-3-derivaten mit gesättigter Seitenkette. (Damit scheiden Indolylbrenztraubensäure und Indolylacrylsäure aus, deren UV-Maxima durch die zusätzliche Mesomerie der Seitenkette

längerwellig sind.) Indolylessigsäure und Indolylpropionsäure scheiden auf Grund ihrer unterschiedlichen R_F-Werte in den genannten Systemen aus. Außerdem reagiert die Substanz negativ mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, so daß die im IR-Spektrum auftretende Carbonylbande einer Carboxylgruppe zuzuordnen ist. Mit Prochazkareagens liefert sie die für Indol-3-derivate mit einer Methylengruppe in α-Stellung typische stark gelbe Fluoreszenz im UV-Licht. Dieses Hauptabbauprodukt des D-Tryptophans, das nach den geschilderten Befunden der Indolylmilchsäure entsprechen dürfte, tritt auch beim Abbau des L-Tryptophans in sehr geringer Menge auf.

p-Aminobenzoesäure wird von Hefewildstamm nicht abgebaut.

4-Methyltryptophan: Während Tryptophan in großem Maße abgebaut wird, beobachtet man beim 4-Methyltryptophan nur wenig Abbauprodukt. Auf Grund der Reaktionen mit verschiedenen Sprühreagentien und des chromatographischen Verhaltens dürfte das einzige nachgewiesene Abbauprodukt 4-Methyltryptophol sein.

p-Fluorphenylalanin: Während 4-Methyltryptophan offensichtlich nur wenig abgebaut wird, treten beim p-Fluorphenylalanin in gut nachweisbarer Menge mehrere Abbauprodukte auf, die papierchromatographisch in Isopropanol/Ammoniak/Wasser aufgetrennt werden konnten. p-Fluorphenyläthanol, bei $R_F = 0,9$ gelegen, tritt auch hier mengenmäßig am meisten auf. Die Substanz mit einem R_F-Wert von 0,5 - 0,6 und einem ähnlichen UV-Spektrum wie p-Fluorphenyläthanol stellt eine Säure dar und dürfte wohl p-Fluorphenylmilchsäure sein. Da diese Substanz nicht mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagiert, scheidet die unter Umständen gleichfalls mögliche p-Fluorphenylbrenztraubensäure aus.
Bei einem Versuchsansatz konnten sogar größere Mengen an p-Fluorbenzoesäure nachgewiesen werden. Diese Säure gibt sich auf Grund

ihres charakteristischen UV-Spektrums, dessen Maximum wegen des negativ-induktiven Effektes des Fluoratoms bei kurzen Wellen liegt (λ_{max} = 231 nm), leicht zu erkennen. Identische R_F-Werte in verschiedenen Chromatographiesystemen mit authentischer p-Fluorbenzoesäure dienten als weitere Identitätsbeweise. Bei allen übrigen Versuchsansätzen konnte jedoch die p-Fluorbenzoesäure nicht wieder nachgewiesen werden.

Der Abbau der aromatischen Aminosäuren und ihrer Analogen, wie p-Fluorphenylalanin und 4-Methyltryptophan, geht also offensichtlich bei Hefe nach demselben Mechanismus vonstatten. Als erster Schritt findet eine oxydative Desaminierung statt, der sich eine Reduktion anschließt. Eine darauffolgende Decarboxylierung führt zu dem um ein C-Atom verkürzten Alkohol, der in allen Fällen Hauptprodukt des Abbaues der Aminosäuren ist. In geringem Ausmaß findet schließlich noch eine α-Oxydation statt, die mit einer Hydroxylierung gepaart sein kann, wie im Falle des Phenylalanins, und zur Bildung aromatischer Carbonsäuren führt.

C. Über die Tryptophanbiosynthese bei Hefen

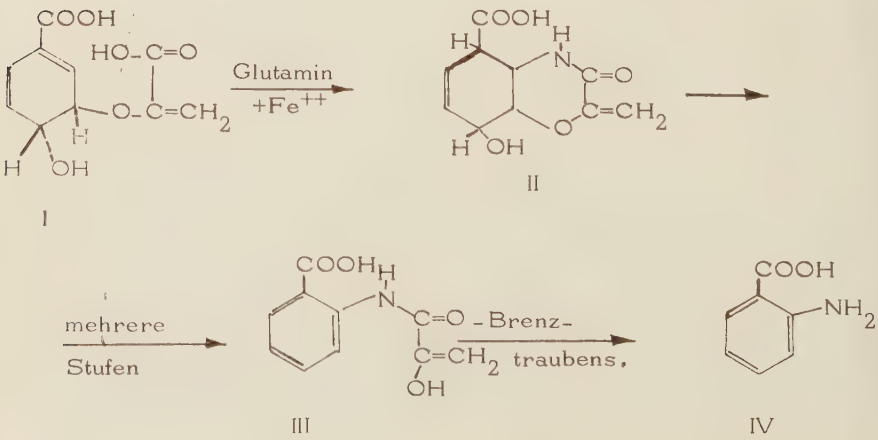
Nachdem sich der vorangegangene Teil der Arbeit mit der Akkumulatbildung bei Mutanten, die unmittelbar hinter dem Verzweigungspunkt in der Aromatenbiosynthese, der Chorisminsäure, blockiert waren, und der Herkunft der auftretenden Akkumulationsprodukte beschäftigte, soll nun im folgenden die Untersuchung der Tryptophanbiosynthese nach der Verzweigung bei Hefen näher geschildert werden.

I Der Weg von der Chorisminsäure zur Anthranilsäure

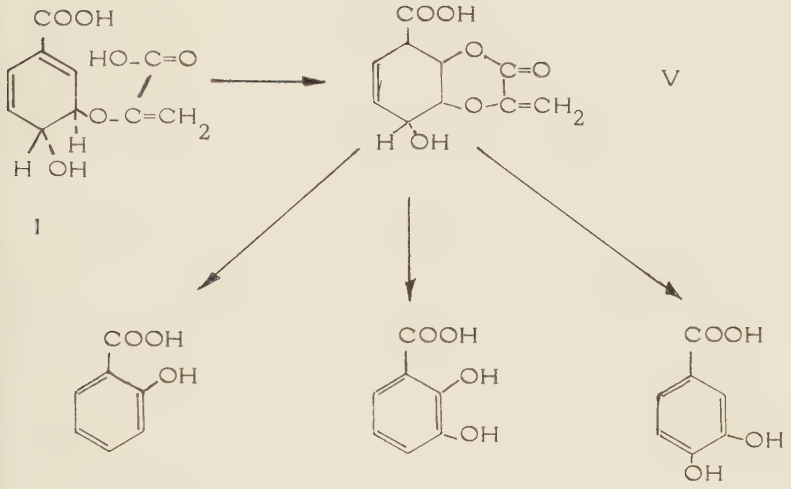
Das erste gesicherte Zwischenprodukt in der Tryptophanbiosynthese nach der Verzweigung ist die Anthranilsäure. Dieser Schritt, der theoretisch drei chemische Reaktionen erfordert, nämlich die Einführung der Aminogruppe in o-Stellung zur Carboxylgruppe, die Abspaltung von Brenztraubensäure aus der m-Stellung und die Eliminierung der Hydroxylgruppe aus der p-Stellung unter Ausbildung des aromatischen Systems, ist in jüngster Zeit Objekt einer Reihe eingehender Untersuchungen gewesen. Bislang wußte man nur aus den enzymatischen Arbeiten von Srinivasan und Rivera (80), daß Shikimisäure-(5)-phosphat - bekanntlich ein Zwischenprodukt des Grundzweiges der Aromatenbiosynthese - in Gegenwart von Glutamin in Anthranilsäure umgewandelt wird, und daßspezifische Glutamininhibitoren wie Díazo-oxo-norleucin und Aza-L-serin diese Übertragung hemmen. Über den Mechanismus der Glutaminsäureübertragung im einzelnen, über die Anzahl der dazu erforderlichen Enzymreaktionen und über möglicherweise auftretende Vorprodukte der Anthranilsäure sagten diese Versuche jedoch nichts aus. Gibson und Mitarbeiter (13) beschäftigten sich in jüngster Zeit mit der enzymatischen Umwandlung von Chorismin-

säure in Anthranilsäure und bestätigten die Angaben von Srinivasan, daß im p_H-Bereich von p_H 7,4 - 8,3 der Amidstickstoff des Glutamins der Amindonator für die Anthranilsäure ist. Bei p_H 9,2 konnte dagegen auch NH_4Cl als Stickstoffquelle dienen. Diese Reaktion war nicht durch Diazo-oxo-norleucin zu hemmen, unterlag aber ebenfalls der Endprodukthemmung durch L-Tryptophan, während D-Tryptophan keinen Einfluß ausübte.

Im Rahmen seiner Arbeit über die Umwandlung von Shikimisäure durch Aerobacter aerogenes, die schon an anderer Stelle erwähnt wurde, fand Ratledge (75) neben Anthranilsäure ein Anthranilsäurederivat, das er in der Struktur nicht genau charakterisieren konnte. Dieses Produkt soll seiner Meinung nach ein N-acyl-derivat der Anthranilsäure sein und u.U. der N-Pyruvyl-anthranilsäure entsprechen. Im Zusammenhang mit dem gleichzeitigen Auftreten der 2,3- und der 3,4-Dihydroxybenzoesäure sowie der Salicylsäure stellte er ein interessantes hypothetisches Reaktionsschema von der Chorisminsäure zur Anthranilsäure auf, das gleichzeitig das Auftreten der aromatischen Hydroxycarbonsäuren erklären soll:

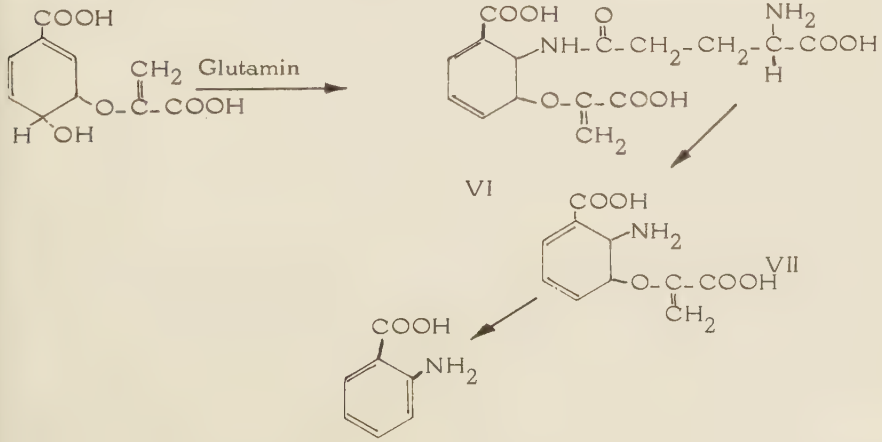


I II III IV



Unter Stickstoffmangelbedingungen soll ein Stickstoff-freier Bicyclus (V) entstehen, von dem aus sich die aromatischen Hydroxycarbonsäuren ableiten sollen.

Einen etwas anderen Reaktionsmechanismus vertreten F. Lingens (81) sowie Levin und Sprinson (82), die nach Einführung des Glutamins Produkte der Formulierung VI und VII postulieren, die sich unter Abspaltung der Brenztraubensäure aromatisieren sollen.



Dagegen neigt De Moss (83) auf Grund seiner jüngst erschienenen Arbeit über die enzymatische Umwandlung von Chorisminsäure in Anthranilsäure durch Extrakte von Neurospora crassa zu der Ansicht, daß die Umwandlung von Chorisminsäure in Anthranilsäure in einem einzigen enzymatischen Reaktionsschritt vor sich geht. Er konnte die wirksame Enzymfraktion anreichern und stellte nach verschiedenen Reinigungsschritten fest, daß es sich nach den elektrophoretischen und serologischen Befunden um ein einziges Enzym oder einen einheitlichen Enzymkomplex handelt, der Chorisminsäure in Anthranilsäure umwandelt. (Anthranilsäure-Synthetase)

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit unternommenen Versuche über dieses Problem scheinen gleichfalls für die zuletzt diskutierte Annahme zu sprechen. Trotz intensiver Suche konnten bei einer Reihe von Tryptophanmutanten mit genetischem Block vor der Anthranilsäure keine postulierten Vorprodukte der Anthranilsäure gefunden werden. Es traten stets nur Akkumulate im Sinne der beschriebenen Verzweigungsprodukte auf. Auch bei Hefemangelmutanten, die hinter der Anthranilsäure blockiert waren und auf deren Akkumulatbildung noch später näher eingegangen werden soll, konnte kein Vorprodukt der Anthranilsäure nachgewiesen werden, obwohl derartige Mutanten bei Kurzzeitakkumulation sogar größere Mengen an Chorisminsäure liefern. Gelegentlich auftretende Anthranilsäurederivate konnten in allen Fällen als Kunstprodukte, die durch Kondensation von Anthranilsäure mit im Medium befindlichen Aldehyden aus dem Kohlenhydratstoffwechsel oder mit Zuckern (z.B. Fructosylanthranilsäure) oder als Umwandlungsprodukte (s.später) erklärt werden.
Schließlich wurden noch die von Ratledge postulierte N-Pyruvylanthranilsäure und die nach dem Reaktionsschema von Lingens möglicherweise auftretende N-Glutaminyl-anthranilsäure enzymatisch

untersucht. Als echte Zwischenprodukte sollten sich diese Substanzen von Extrakten, die das zur Bildung der Anthranilsäure führende Enzymsystem enthalten, in Anthranilsäure umgewandelt werden. Die beiden Verbindungen wurden von Lingens und Sprößler (84) synthetisiert. Glücklicherweise wird die N-Glutaminylanthranilsäure nicht von unspezifischen Amidasen hydrolysiert, wie Sprößler mit Hilfe der Leucinaminopeptidase zeigen konnte (85). Für die enzymatische Untersuchung wurden Extrakte aus Hefemangelmutanten, die noch in der Lage sind, Anthranilsäure zu synthetisieren (E 107 und B 6), hergestellt und die oben angeführten postulierten Zwischenprodukte unter geeigneten Bedingungen angeboten. Beide Substanzen erwiesen sich auf Grund dieses enzymatischen Testes als biologisch unwirksam. In keinem Inkubationsansatz trat freie Anthranilsäure auf. Zur Kontrolle wurde die Bildung von Anthranilsäure aus Shikimisäure, Glutamin und Brenztraubensäure herangezogen. In diesem Ansatz ließ sich gut Anthranilsäure nachweisen.

Außerdem wurde noch ein Test mit Enzymextrakten aus Bäckerhefe unternommen, wobei die Konzentration der eingesetzten Anthranilsäurederivate über UV-Absorption verfolgt wurde. In keinem Fall ließ sich eine Abnahme der eingesetzten Substrate feststellen. Damit scheiden N-Pyruvylanthranilsäure und N-Glutaminylanthranilsäure als mögliche Vorprodukte der Anthranilsäure aus.

II Der Weg von der Anthranilsäure zum Tryptophan bei Hefe

Für die Untersuchung der Tryptophanbiosynthese von der Anthranilsäure bis zum Tryptophan standen uns mehrere Mutanten zur Verfügung, die mit Indol und Tryptophan zum Wachstum gebracht werden können, ihren genetischen Block also vor dem Indol haben. Außerdem gab es eine Reihe von Mutanten, die nur mit Tryptophan wachsen, was dafür sprach, daß sie im Schritt Indol → Tryptophan blockiert sind. Nach dem bekannten Reaktionsschema hätte man erwarten sollen, daß die Mutanten des ersten Typs Anthranilsäure, die Amadoriverbindung des Ribosylamins der Anthranilsäure oder Indolylglycerin akkumulieren sollten, während bei der anderen Gruppe von Mutanten Indol als Akkumulat zu erwarten gewesen wäre. Tatsächlich lagen die Verhältnisse jedoch völlig anders. Zwar gab es Mutanten, die nur Anthranilsäure als Akkumulat aufwiesen, die Mehrzahl der untersuchten Mutanten beider oben angeführter Gruppen lieferte jedoch eine ganze Reihe noch unbekannter Verbindungen, die mit keinem der bekannten Zwischenprodukte der Tryptophanbiosynthese identisch waren. Schon nach kurzer Akkumulationsdauer zeigten die Minimalmedien eine intensive Blaufluoreszenz unter der UV-Lampe. Bereits eine UV-Überstandsmessung der Kulturflüssigkeit ließ jedoch erkennen, daß es sich um ein komplexes Akkumulationsgemisch handeln müsse, denn neben den UV-Maxima der Anthranilsäure bei 325 nm und 247 nm (Wasser als Lösungsmittel p_H 3,5-4) - traten noch deutlich die typischen Indolbanden bei 290, 283, 272 s nm auf, die das Auftreten von Indol oder Indolderivaten vermuten ließen. Eine papierchromatographische Trennung der Akkumulate in Isopropanol/Ammoniak/Wasser ergab eine deutliche Auftrennung in 3 blaufluoreszierende Flecke, R_F 0,3, 0,35, 0,4, von denen der mittlere bei R_F= 0,35 Anthranilsäure darstellte, während die beiden anderen

im folgenden mit den Bezeichnungen A I (R_F= 0,3) und A II (R_F= 0,4) belegt werden sollen. Bei R_F= 0,75 - 0,9 war eine diffuse, unter der UV-Lampe löschende Substanzzone zu beobachten. Dieser Fleck konnte über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-HF_{254} - Platten in 3 Flecke aufgetrennt werden, die sich auf diesen Schichten als löschende Flecke auf fluoreszierendem Untergrund zu erkennen gaben. Diese 3 Substanzen sollen im folgenden mit I_1 , I_2 und I_3 bezeichnet werden.
Bevor näher auf die Untersuchung über die Strukturen dieser Substanzen eingegangen wird, soll zunächst ein allgemeiner Überblick über die untersuchten Mutanten und ihre jeweils akkumulierten Produkte gegeben werden.

Tabelle 4:

	Akkumulationsprodukte									Wachstum mit
Mutante	A	Amad.	IG	Indol	AI	AII	I_1	I_2	I_3	
HK 51	++	-	-	-	+	+	(+)	++	+	Tryptophan
E 107	+	-	-	-	+	+	+	+	++	Indol, Tryptophan
HK 218	+	-	-	-	+	+	(+)	++	+	Tryptophan
HK 163	+	-	-	-	+	+	(+)	+	+	Tryptophan
HK 226	+	-	-	-	+	+	(+)	+	+	Tryptophan
KP 10	+	-	-	-	++	+	(+)	++	+	Tryptophan
KP 30	+	-	-	-	++	+	(+)	+	+	Tryptophan
AE 7	+	-	-	-	+	+	+	+	++	Indol, Tryptophan
1071-3B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Indol, Tryptophan
HK 175	+	-	-	-	+	(+)	+	+	++	Indol, Tryptophan
HK 182	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	Indol, Tryptophan
HK 167	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Indol, Tryptophan
B 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Indol, Tryptophan

Fortsetzung von Tab. 4:

Mutante	A	Amad.	IG	Indol	AI	AII	I_1	I_2	I_3	
G 68	+	-	-	-	+	+	+	+	+	Indol, Tryptophan
H 19	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	Indol, Tryptophan
HK 145	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Indol, Tryptophan

Auf Grund der Akkumulationsprodukte lassen sich zusammen mit den Wachstumsergebnissen 4 verschiedene Arten von Mutanten unterscheiden:

1.) Mutanten, die mit Indol und Tryptophan wachsen und nur Anthranilsäure akkumulieren (1071-3B, HK 182, HK 167, B 6, H 19). Die Mutanten sind offensichtlich unmittelbar hinter der Anthranilsäure blockiert.

2.) Mutanten, die mit Indol und Tryptophan wachsen und Anthranilsäure und das Amadoriprodukt der Anthranilsäure liefern (HK 145).

Der genetische Block dürfte hier wohl im Schritt 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxyribulose-5-phosphat → Indolylglycerinphosphat liegen.

3.) Mutanten, die ebenfalls mit Indol und Tryptophan wachsen und neben Anthranilsäure die Produkte AI und AII, sowie I_1, I_2 und I_3 liefern. Es ist anzunehmen, daß diese Mutanten die Reaktion Indolylglycerinphosphat → Indol nicht mehr durchführen können (E 107, AE 7, HK 175, G 68).

4.) Mutanten, die nur noch mit Tryptophan zum Wachstum zu bringen sind und dieselben Produkte wie Mutanten des Typs 3 akkumulieren. Es lassen sich lediglich gewisse quantitative Unterschiede in den Produkten I_1, I_2, I_3 feststellen, auf die an anderer Stelle näher eingegangen werden soll (HK 51, HK 218, HK 163, HK 226, KP 10, KP 30).

1.) Isolierung und Identifizierung des Ribulose-Amadori-derivates der Anthranilsäure

Extrahierte man das Minimalmedium der Mutante HK 145 mit Äther, so ließ sich in der Ätherphase in relativ großer Menge Anthranilsäure nachweisen. Trotz mehrmaligen Extrahierens fluoreszierte jedoch die Kulturflüssigkeit noch intensiv blau unter der UV-Lampe. Das ließ vermuten, daß noch eine weitere blaufluoreszierende Komponente als Akkumulat bei dieser Mutante vorliegt. Während in der Ätherphase nach Chromatographie nur Spuren einer zweiten blaufluoreszierenden Komponente festzustellen waren, ließen sich durch Extrahieren mit Essigester größere Mengen davon gewinnen. Die Auftrennung der blaufluoreszierenden Komponente gelingt über Papierchromatographie im System Methanol/Benzol/Buthanol/Wasser in befriedigender Weise (Anthr. R_F=0,95 und X R_F=0,85). Wesentlich besser ist die Trennung im System Methanol/Chloroform/Eisessig über Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G.

Die Trennung konnte auf eine entsprechende Kieselgel-Säule übertragen und die zweite blaufluoreszierende Komponente in größerer Menge in kristalliner Form gewonnen werden. Das UV-Spektrum (346 nm, 257 nm) deutet auf ein N-substituiertes Anthranilsäurederivat hin, denn im sauren Milieu trat lediglich eine Verschiebung nach längeren Wellen unter gleichzeitiger Abnahme der Extinktion auf (355 nm, 257,5 nm), während bei freier Aminogruppe durch die Protonisierung im sauren Milieu das charakteristische UV-Spektrum der Anthranilsäure verschwindet und nur das kürzerwellige extinktionsschwache Spektrum der Benzoesäure auftritt. Mit Ehrlich's Reagens auf aromatische Amine reagierte die Substanz nach längerer Zeit unter Gelbfärbung. Den charakteristischen Nachweis erbrachte die Reaktion mit Dische-Reagens auf Zucker. Nach Erwärmen reagierte der Substanzfleck unter Dunkelgrünfär-

bung, was eindeutig für eine Ketopentose spricht. Die Identität mit 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose konnte durch gleiches chromatographisches, spektroskopisches und reaktives Verhalten mit dem authentischen, von Schraven (86) synthetisierten, Produkt bewiesen werden. 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose konnte damit auch bei Hefen als Zwischenprodukt der Tryptophanbiosynthese erstmals nachgewiesen werden.

2.) Versuche zur Aufklärung der Akkumulate AI und AII

Die beiden Produkte AI und AII fluoreszierten im UV-Licht intensiv blau. Dieses Phänomen ließ vermuten, daß es sich um Anthranilsäurederivate handelt. Mit Äther konnte auch hier nur eine geringe Extraktion erreicht werden, während durch mehrmaliges Ausschütteln mit Essigester die Produkte nahezu quantitativ aus der Kulturflüssigkeit herausgeholt wurden. Die Produkte ließen sich auch im Gegensatz zur Anthranilsäure und dem oben beschriebenen Amadoriderivat aus sodaalkalischem Milieu mit Essigester extrahieren. Dieser Befund sprach dafür, daß keine freie Carboxylgruppe in der Verbindung vorhanden ist. Wie schon eingangs erwähnt, lassen sich beide Verbindungen von der Anthranilsäure im System Isopropanol/Ammoniak/Wasser scharf trennen. Eluiert man die Substanzzonen mit Methanol und mißt die UV-Spektren der Verbindungen, so stellt man einen eigenartigen Verlauf der Spektren fest. Sie enthalten mit den Banden bei 342 nm und 250 nm bzw. 345 nm und 251 nm die charakteristischen UV-Maxima von Anthranilsäure bzw. Anthranilsäurederivaten. Daneben treten aber bei 290 nm, 283 nm, 270 nm noch Banden auf, wie sie bei 3-substituierten Indolderivaten beobachtet werden (s. Abb. 2). Das Verschwinden der Anthranilsäurebanden im sauren Milieu spricht für das Vorliegen einer freien Aminogruppe, dagegen bleiben die

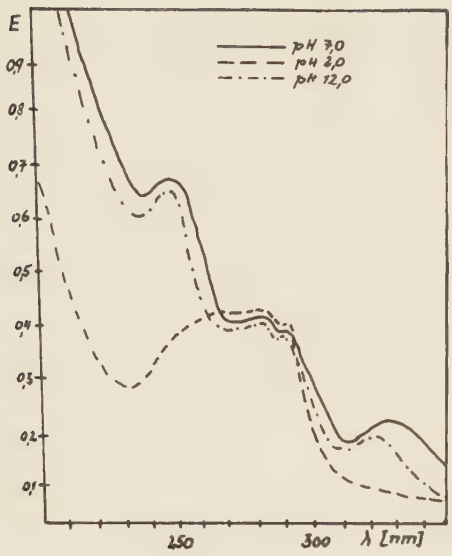


Abb. 2: UV-Spektrum von A I

indolähnlichen Banden erhalten. Im Alkalischen beobachtet man die normale kurzwellige Verschiebung der Anthranilsäurebanden. Da zunächst der Verdacht auftrat, es könnte sich um ein aus zwei verschiedenen Substanzen zusammengesetztes UV-Spektrum handeln, wurden die ausgeschnittenen Substanzzonen erneut in mehreren sauren, alkalischen und neutralen Papier- und Dünnschichtsystemen chromatographiert. In allen erwiesen sie sich als einheitlich und ergaben dieselben UV-Spektren.

Die beiden Substanzen A I und A II gaben mit verschiedenen charakteristischen Sprühreagentien folgende Reaktionen:

Reagentien	A I	AII
Ehrlich's Reagens	positiv	positiv
auf aromatische Amine	Gelbfärbung	Gelbfärbung

Reagentien	A I	A II
Glucose/Phosphorsäure auf aromatische Amine	Braunfärbung	Braunfärbung
Echtblausalz B auf Amine und Phenole	positiv Braunfärbung	positiv Braunfärbung
2,4-Dinitrophenylhydrazin	negativ	positiv
Kaliumperjodat/Benzidin auf cis-Diole	(negativ)	positiv
Triphenyltetrazoliumchloridlösung auf red. Subst.	negativ	negativ
Ninhydrin	negativ	negativ
Anilinphthalat auf Zucker	negativ	positiv-rötlichbraun
Dische-Reagens auf Zucker	negativ	positiv-rosarot
Kaliumperjodat/Schwefelsäure	positiv intensiv rot	positiv, rot

Das zuletzt genannte Sprühreagens hat sich auf Grund der intensiven Rotfärbung zum Erkennen der Produkte auf dem Papierchromatogramm besonders gut bewährt, denn damit reagieren die anderen blaufluoreszierenden Substanzen, wie Anthranilsäure oder Fructosylanthranilsäure, nicht. Es dürfte sich wohl um eine unspezifische Oxydationsreaktion dieser Substanzen handeln. Eine etwas schwächere Rotfärbung beobachtet man auch mit diesem Reagens bei bestimmten Indolderivaten. Die zu untersuchenden Akku-

mulationsprodukte A I und A II unterscheiden sich demnach in ihren Reaktionen darin, daß A II mit solchen Reagentien positiv reagiert, die für einen Zuckerrest sprechen, während A I in all diesen Fällen negativ reagiert. Da die Reaktionen mit den übrigen Sprühreagentien in beiden Fällen gleich und auch die spektroskopischen Eigenschaften nahezu identisch sind, scheinen sich die beiden Produkte nur darin zu unterscheiden, daß A II einen Zuckerrest trägt, während A I an derselben Stelle einen uncharakteristischeren Rest besitzt. Die Rotfärbung mit Dische-Reagens und die Rotbraunfärbung mit Anilinphthalat spricht für eine Pentose als Zuckeranteil.

Chemische Umsetzungen:
Behandelt man A I und A II einen Tag lang bei Zimmertemperatur mit 25 % Salzsäure, so läßt sich gut Anthranilsäure nachweisen. A II scheint leichter zu hydrolysieren als A I, denn bei A I konnten noch größere Mengen unumgesetzten Ausgangsmaterials nachgewiesen werden, was bei A II nicht der Fall war. Ein Zuckerrest ist im Falle von A II nach Salzsäurebehandlung nicht nachzuweisen, was bei den kleinen Mengen an eingesetztem Material und dem stark sauren Medium auch kaum zu erwarten war. Bei A I ließen sich neben Anthranilsäure noch 2 UV-inaktive Substanzflecke mit Perjodat/Benzidin auf dem Papierchromatogramm nachweisen, die u.U. den fraglichen Rest R, bzw. Umwandlungsprodukte davon darstellen könnten.
Damit war geklärt, daß in beiden Fällen Anthranilsäure in irgendeiner Form enthalten war. Da mit allen diesen Reaktionen der wirklichen Struktur dieser Verbindungen nicht näher zu kommen und vor allem das Auftreten der indolartigen Banden im UV-Spektrum nicht zu erklären war, wurde versucht, die Strukturaufklärung über Massenspektroskopie zu erreichen. Da A I die stabilere Substanz ist und auch in größerer Menge als A II als Akkumulat zu erhalten

war, wurde versucht, über Papierchromatographie dieses Produkt anzureichern. Durch Eluieren der entsprechenden Substanzzonen aus einer großen Anzahl in Isopropanol/Ammoniak/Wasser entwickelter Papierchromatogramme und erneutem Chromatographieren, konnte soviel reines Produkt A I als zähe bräunliche Masse gewonnen werden, daß sich ein Mikro-Massenspektrum davon anfertigen ließ. Das erhaltene Massenspektrum von A I ist in Abb. 3 wiedergegeben.

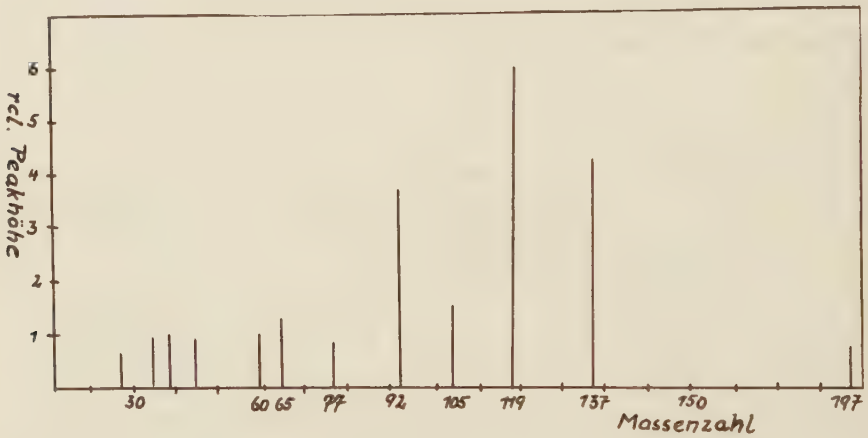
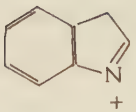
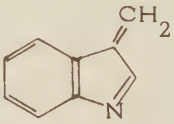


Abb. 3 : Massenspektrum von A I

Das Molekulargewicht von A I ist demnach 197 (bis 280 tritt keine weitere Massenzahl auf). Ein Indolring dürfte mit Sicherheit nicht enthalten sein, da die typischen Ionen fehlen.

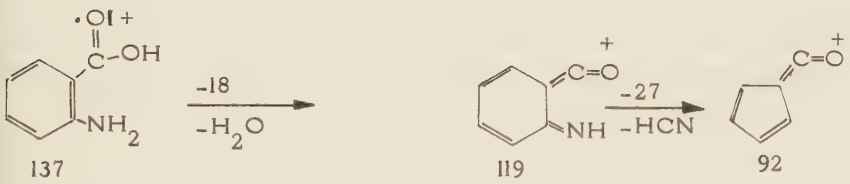


(M = 117) und



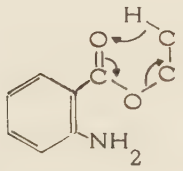
(M = 129)

Dagegen ist die Anthranilsäure gesichert durch die Massenzahlen 137, 119 und 92, die folgender Fragmentierung entsprechen:

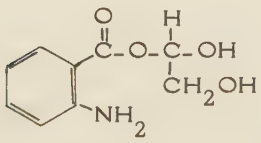


137 119 92

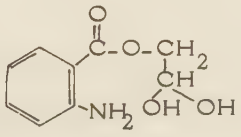
Es ist anzunehmen, daß 137 durch folgende Fragmentierung entsteht:



Das Bruchstück M - 137 = 60 entspricht also wahrscheinlich einem Rest, der an der COOH-Gruppe sitzt, mindestens 2 C-Atome und in ß-Stellung mindestens 1 H-Atom hat. Nach dem Molgewicht könnte es z.B. Glycolaldehyd sein. Darüber ist jedoch dem Massenspektrum keine eindeutige Aussage zu entnehmen. Mögliche Strukturen für die Verbindung A I wären demnach:



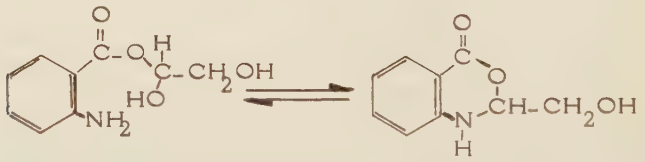
a.



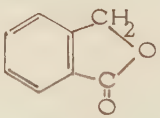
b.

Tatsächlich könnte der obere Perjodat/Benzidin positive Fleck, der nach Spaltung von A I mit 25 % HCl entsteht, dem Glycolaldehyd entsprechen, denn authentisches Glycolaldehyd liegt bei demselben R_F-Wert. Außerdem reagiert der Substanzfleck wie Glycolaldehyd positiv mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.
Die indolartigen Banden des UV-Spektrums verschwinden, wenn man A I mit $LiAlH_4$ reduziert, was ebenfalls eindeutig gegen eine echte Indolstruktur der Verbindung spricht, denn Indole lassen sich mit $LiAlH_4$ nicht reduzieren. Nach Reduktion erhält man eine Substanz mit völlig anderen UV-Eigenschaften (λ_{max} = 252 nm im neutralen Milieu und λ_{max} = 256 nm im sauren Milieu).
Das Auftreten der indolartigen Banden dürfte auf einer reversiblen Ringschlußreaktion beruhen.

z.B.



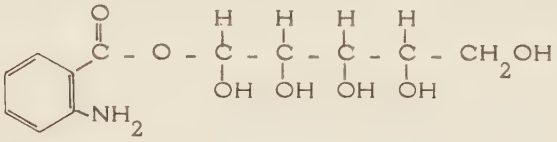
Während dem offenkettigen Produkt die Anthranilsäurebanden zuzuordnen wären, könnte das Auftreten des ringgeschlossenen Produktes die indolartigen Banden bewirken. Das ähnlich gebaute Phthalid



besitzt gleichfalls derartige UV-Maxima bei 280 nm (ε = 3.22) und 273 nm (ε = 3.23). Die Einführung der NH-Gruppe im Falle von AI könnte die längerwelligen Maxima von 290 nm und 283 nm erklären. Gewisse Anhalts-

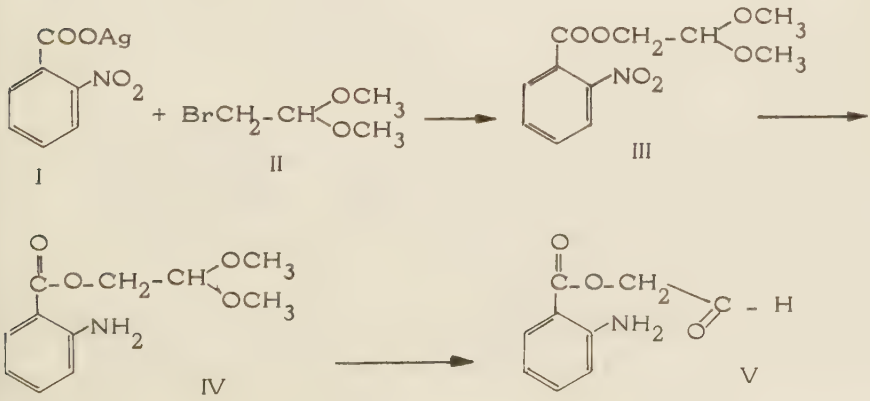
punkte für das Vorliegen eines derartigen Gleichgewichts geben UV-spektroskopische Untersuchungen von A I in Äther als Lösungsmittel. Während in Methanol als Lösungsmittel die Anthranilsäuremaxima mit geringerer Extinktion auftreten als die indolartigen Banden, ist es in Äther als Lösungsmittel genau umgekehrt. Fügt man jedoch Methanol hinzu, so geht die Extinktion der Anthranilsäurebanden zurück, während die der "Indol"-Banden zunimmt.

Das andere Anthranilsäurederivat A II könnte eine entsprechende Esterstruktur besitzen mit Ribose anstelle von Glycolaldehyd.



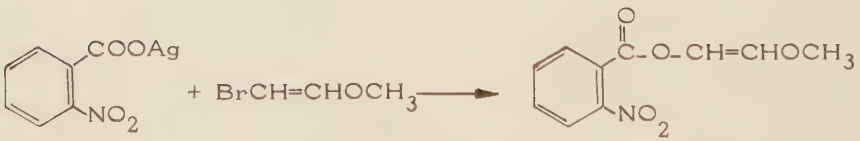
3.) Versuche zur Synthese von A I

Um die analytischen Strukturbeweise zu untermauern, wurden Versuche zur Synthese von A I unternommen. Die nach dem Massenspektrum mögliche Form b sollte auf folgendem Wege synthetisiert werden:



Wie sich jedoch zeigte, verläuft die Umsetzung von I mit II nur in sehr schlechter Ausbeute. Während in absolutem Äther und absolutem Benzol überhaupt kein Reaktionsprodukt gebildet wird, erhielt man nach 2-tägigem Kochen in absolutem Dioxan eine geringe Umsetzung (< 5 %). Dabei handelte es sich jedoch noch um ein Gemisch aus mehreren Substanzen, wie eine dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionslösung ergab. Als Hauptprodukt ließ sich o-Nitrobenzoesäure identifizieren. Außerdem traten größere Mengen Silber auf. Die neutralen Umsetzungsprodukte ließen sich durch Extrahieren mit Essigester aus sodaalkalischem Milieu abtrennen. In der Essigesterphase konnten noch immer 4 Substanzen nachgewiesen werden. Von diesen reagierten drei positiv mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, während die vierte mit OsO_4 rasche Schwärzung ergab, was auf eine aliphatische Doppelbindung im Molekül schließen ließ. Offensichtlich laufen unter den Bedingungen folgende Nebenreaktionen ab:

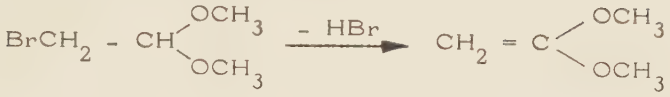
$$BrCH_2\text{-}CH\langle^{OCH_3}_{OCH_3} \longrightarrow BrCH = CHOCH_3$$



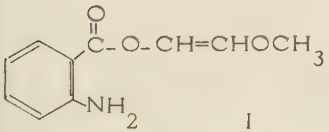
Es ist bekannt, daß zwischen Acetalen, die in Nachbarstellung wenigstens ein Wasserstoffatom tragen und den durch Abspaltung von einem Molekül Alkohol entstehenden Aldehydenoläthern ein Gleichgewicht besteht, welches bei höheren Temperaturen stets auf der Seite der Enoläther liegt.

Daneben könnte aus dem Bromacetaldehydacetal durch Eliminierung von HBr das sehr reaktionsfähige Ketenacetal entstehen, das zu

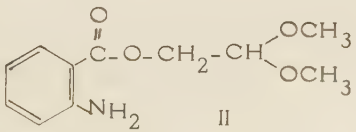
weiteren Folgereaktionen führen kann.



Die vier durch Extraktion mit Essigester erhaltenen Umsetzungsprodukte wurden über eine Kieselgel-H-Säule mit Benzol-Methanol als Elutionsmittel getrennt. Man erhielt auf diese Weise von jedem Produkt wenige Milligramme öligen Materials.
Die anschließende Reduktion mit Wasserstoff und Platin als Katalysator verlief bei allen 4 Substanzen gut. Während drei der reduzierten Verbindungen wie die meisten Anthranilsäurederivate blaue Fluoreszenz unter der UV-Lampe zeigten, ergab die vierte Substanz einen löschenden Fleck auf dem Chromatogramm. Alle reagierten positiv mit Ehrlich's Reagens. Das zeigte, daß die Reduktion von der Nitro- zur Aminogruppe erfolgt war. Dagegen besaßen nur zwei der blaufluoreszierenden Umsetzungsprodukte die für Anthranilsäureester zu erwartenden UV-Spektren, (im neutralen Milieu 334 nm bzw. 339 nm und 247 nm bzw. 248 nm). Diese beiden Verbindungen, die auf Grund ihrer Eigenschaften für das gewünschte Umsetzungsprodukt in Frage kamen, ließen sich mit OsO_4 und 2,4-Dinitrophenylhydrazin unterscheiden. Während die eine (I) momentane Schwärzung mit OsO_4 aber keine Reaktion mit 2,4-DNPH zeigte, reagierte die andere (II) mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, aber nicht mit OsO_4. Danach kamen den beiden Verbindungen wahrscheinlich folgende Strukturen zu:



I



II

Die Substanz mit der Struktur II stellt das gewünschte Umsetzungsprodukt dar. Es zeigte sich, daß sie gegen Säure recht labil ist. Nach kurzzeitigem Erwärmen mit verd. Salzsäure erhielt man nur Anthranilsäure. Beim Stehenlassen in 2 n Salzsäure bei 0°C konnten nach 10 Stunden neben unumgesetztem Ausgangsmaterial und wenig Anthranilsäure eine weitere blaufluoreszierende Komponente erhalten werden, die mit Ehrlich's Reagens und 2,4-Dinitrophenylhydrazin reagierte.

Das erhaltene Produkt stimmte weder chromatographisch noch spektroskopisch mit dem als Akkumulat isolierten Anthranilsäure-Glycolaldehyd-Ester überein.

4.) Biologische Untersuchungen bei den Anthranilsäureestern A I und A II

Ebenso interessant wie die Strukturaufklärung war die Frage nach der biologischen Herkunft dieser beiden Anthranilsäureester. Läßt man eine geeignete Hefemutante nur kurzzeitig akkumulieren (2,5 Std.) und arbeitet dann sofort das Medium auf, so findet man relativ viel A II (Anthranilsäure-ribose-ester), während A I (Anthranilsäure-glycolaldehyd-ester) noch relativ wenig vorhanden ist. Nach einer Akkumulationsdauer von 1 - 2 Tagen dagegen liegen die Verhältnisse genau umgekehrt. Nach dieser Zeit ist von A II kaum noch etwas zu finden, während A I in viel größerer Menge auftritt. Das spricht dafür, daß eine Umwandlung von A II in A I stattfindet. Da diese Verbindungen als Akkumulate erst bei Mutanten auftreten, die relativ weit hinten in der Tryptophanbiosynthese blockiert sind, können sie mit Sicherheit als Vorprodukte der Anthranilsäure ausgeschlossen werden. Ebenso wenig dürften sie echte Zwischenprodukte der Tryptophanbiosynthese bei

Hefen sein, denn - wie gezeigt werden konnte - tritt bei Hefe neben der Anthranilsäure auch 1-(o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-ribulose als Akkumulat auf. Außerdem sind beide Verbindungen im Wachstumstest negativ. Der geringe Wachstumseffekt, der mit A II (Anthranilsäure-Zucker-ester) zu beobachten ist, dürfte wohl auf dem leichteren Zerfall in Anthranilsäure beruhen. Es ist wahrscheinlich, daß diese Anthranilsäureester Umwandlungsprodukte von echten Zwischenprodukten der Tryptophanbiosynthese sind. In Frage kämen dafür praktisch nur die Anthranilsäure und die beiden Anthranilsäure-Zuckerderivate. Davon scheidet Anthranilsäure aus, denn Anthranilsäure wird weder von Hefewildstamm noch von geeigneten Mutanten in einen der beiden Anthranilsäureester umgewandelt. Mit dem Ribosylamin der Anthranilsäure und der entsprechenden Amadori-Verbindung sind derartige Versuche kaum durchzuführen, denn ersteres ist als Akkumulat nicht zu erhalten, während letzteres in der unwirksamen entphosphorylierten Form als Akkumulat auftritt. Trotzdem wurde die Amadoriverbindung sowohl ganzen Hefezellen als auch unter geeigneten Bedingungen einem zellfreien Extrakt angeboten. Wie zu erwarten war, traten keine Umsetzungen ein.

III Die Indolderivate

Wie anfänglich erwähnt, treten neben den bereits geschilderten Produkten bei einer Reihe von Mutanten, die zwischen Anthranilsäure und Tryptophan blockiert sind, verschiedene unbekannte Indolderivate auf. Mutanten, die mit Indol zum Wachstum zu bringen sind und eigentlich Indolylglycerin akkumulieren sollten, liefern 3 Indolderivate:

I_1 in geringerer Konzentration

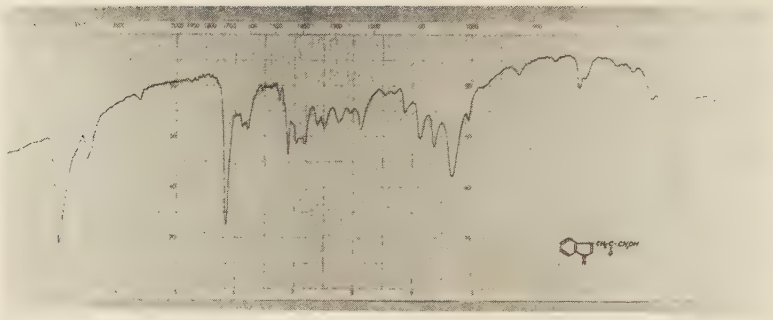


Abb. 4: IR-Spektrum von 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol

Mit folgenden Sprühreagentien zeigt das Indolderivat I_3 positive und charakteristische Reaktionen:

1 Ehrlich's Reagens	Gelbfärbung, die sich nach violett umwandelt
2 Prochazka Reagens	Unter der UV-Lampe stark gelb fluoreszierend
3 Salkowsky Reagens	Unter der UV-Lampe gelb-braun fluoreszierend
4 Eisen-III-chlorid	braunrot
5 Perjodat/Benzidin	positiv
6 ammoniak. Silbernitrat	momentane Schwarzfärbung
7 2,4-Dinitrophenylhydrazin	Gelbfärbung (Hydrazonbildung)
8 TTC	in der Kälte Rotfärbung
9 o-Phenylendiamin	unter UV stark hellgelbe Fluoreszenz.

Die Reaktionen mit den Sprühreagentien 1-3 deuten auf den Indolcharakter der Verbindung hin. Besondere Bedeutung hat dabei das Prochazka-Reagens (ein Gemisch aus Formaldehyd und Salz-

säure), das nur mit 3-substituierten Indolderivaten fluoreszierende Reaktionsprodukte gibt. Aus der Art der Fluoreszenz kann man sogar Aussagen machen über die Gruppe in α-Stellung. Während eine $-CH_2-$Gruppe eine intensive Gelbfluoreszenz hervorruft, wie sie auch bei I_3 beobachtet wird, bewirkt eine Hydroxylgruppe in α-Stellung, z.B. bei Indolylglycerin, eine starke Verminderung der Fluoreszenz. Die hierbei auftretenden Reaktionsprodukte fluoreszieren nur noch schwach gelbgrün. Eine Carbonyl- oder Carboxylgruppe in α-Stellung führt zur völligen Unterdrückung der Fluoreszenz. Bei derartigen Indolderivaten treten ähnlich wie beim Indol selbst schwach gefärbte, jedoch nicht fluoreszierende Reaktionsprodukte auf.

Die Reaktionen mit Silbernitrat und Triphenyltetrazoliumchlorid weisen auf reduzierende Eigenschaften der Verbindung hin. Die Hydrazonbildung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin spricht für eine Keto- oder Aldehydgruppe in der Seitenkette. Da die Verbindung nicht sauer reagiert, ist auch die im IR-Spektrum auftretende Carbonylbande einer derartigen Gruppe zuzuordnen. Perjodat/Benzidin gibt positive Spaltungsreaktionen mit cis-Diolen oder α-Hydroxyketonen bzw. -aldehyden. Es ist daher anzunehmen, daß sich in Nachbarstellung zur $-C=O$ Gruppe noch mindestens eine Hydroxylgruppe befindet. Dafür spricht auch die stark positive Reaktion mit o-Phenylendiamin, das mit Verbindungen mit Acetolstruktur unter Bildung von Chinoxalinen reagiert. Aus den Reaktionen mit den erwähnten Sprühreagentien lassen sich zusammen mit den spektroskopischen Befunden für I_3 damit folgende Strukturmerkmale ableiten: Es handelt sich um ein 3-substituiertes Indolderivat, das in α-Stellung eine $-CH_2-$Gruppe trägt, außerdem eine $-C=O$-Gruppierung und in Nachbarstellung dazu mindestens eine Hydroxylgruppe.

In der Hoffnung zu schon bekannten Indolderivaten zu gelangen, wur-

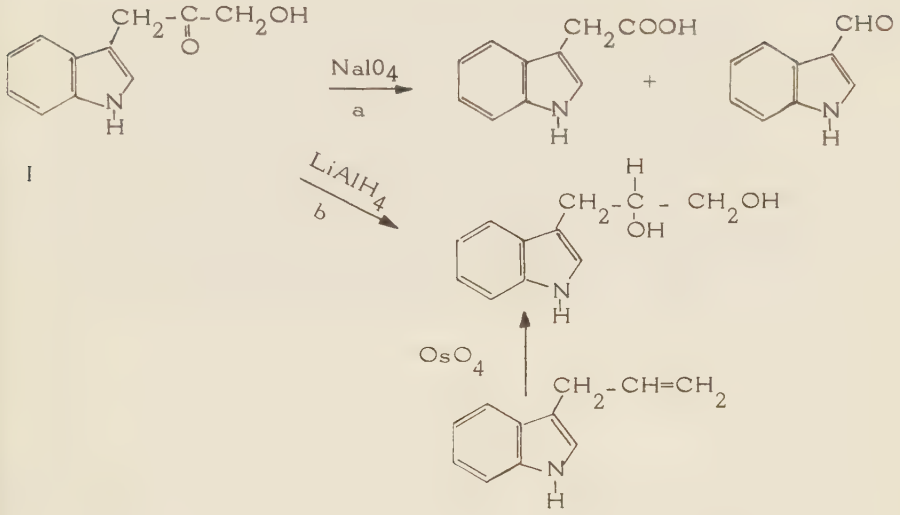
den mit I_3 folgende chemische Umwandlungen durchgeführt:

a.) Spaltung mit Natriumperjodat: Nachdem schon auf dem Chromatogramm die Reaktion mit Perjodat/Benzidin positiv ausgefallen war, interessierte die Frage, welches Indolderivat bei dieser Umsetzung entsteht. Läßt man Natriumperjodat in schwachsaurer Lösung mehrere Stunden bei Zimmertemperatur auf die Substanz einwirken, so kann man chromatographisch 2 Indolderivate im Reaktionsgemisch nachweisen, von denen keines mit der Ausgangssubstanz identisch ist. Der im System Chloroform/Methanol/Eisessig schneller wandernde Fleck läßt sich auf Grund seiner positiven Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin und dem charakteristischen UV-Spektrum, das im Neutralen ein Maximum bei 294 nm hat, während es im alkalischen Milieu nach 330 nm verschoben wird, leicht als Indol-3-aldehyd identifizieren. Der in wesentlich höherer Konzentration auftretende zweite Indolfleck stellt eine Säure dar und erwies sich auf Grund gleicher R_F-Werte in verschiedenen Laufmittelsystemen als Indolyl-3-essigsäure.

b.) Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid:

Den endgültigen Beweis für die Struktur des Indolderivates I_3 lieferte die Reduktion der Substanz mit $LiAlH_4$. Nach Ablauf der Reaktion ließ sich nur ein Indolderivat nachweisen, das nach dem chromatographischen Verhalten, dem IR-Spektrum, dem Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt völlig identisch war mit 3-Indolyl-(3)-propandiol-1,2. Dieses Indolderivat war nach der Vorschrift von Brown, Heubert und Jones (87) aus Allylindol und Osmiumtetroxyd gewonnen worden. Da die Reduktion mit $LiAlH_4$ nicht zu einer C-C-Spaltung führt, ist die Struktur von I_3 damit festgelegt. Es handelt sich demnach bei I_3 um 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol (I).

Reaktionsschema der angeführten Umsetzungen:



Das im Falle der Reaktion a.) auftretende Indol-3-aldehyd läßt sich auf Grund der aktivierten Methylengruppe in α-Stellung erklären. Indol-3-aldehyd tritt auch bei Indolderivaten wie Indolyl-3-aceton, Indolyl-3-acetaldehyd, Indolylacetonitril usw. auf, die alle dieselbe Aktivierung der α-Methylengruppe haben.

2.) Strukturaufklärung des Indolderivates I_2

Die langsamer wandernde Indolkomponente I_2 ähnelt in ihren Eigenschaften dem 3-Indolyl-(3)-glycerin. In den üblichen Papierchromatographiesystemen ließen sich I_2 und Indolylglycerin nicht voneinander trennen. Erst die Dünnschichtchromatographie in Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 führte zu einer klaren Trennung der beiden Komponenten. I_2 liegt hier bei R_F= 0,55, während Indolylglycerin bei 0,2-0,5 zu finden ist.

Der Fleck von I_2 färbt sich auf der DS-Platte nach kurzem Liegenlassen an der Luft intensiv rot, was für eine ziemliche Oxydationsempfindlichkeit der Substanz spricht. Bei Indolylglycerin ist dies nicht in so starkem Maße der Fall. Hier kommt es lediglich zu einer schwachen Bräunung nach längerer Zeit.
Auf der entwickelten Kieselgel-Platte zeigt I_2 folgende Reaktionen mit Sprühreagentien:

Ehrlich's Reagens	gelb bis gelbbraun
Prochazka Reagens	gelb-grün fluoreszierend
Perjodat/Benzidin	positiv
TTC	negativ
Silbernitrat	negativ
2,4-Dinitrophenylhydrazin	negativ
Säurereagens	negativ
Dische-Reagens auf Pentosen	rot-violett
Anilin/Diphenylamin/H_3PO_4	karminrot

Mit 1,3,5-Trinitrobenzol bildet I_2 ebenso wie das beschriebene 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol keinen Additionskomplex.

a) Spektroskopische Befunde:

Das UV-Spektrum entspricht genau wie das von I_3 dem Typ eines 3-substituierten Indolderivates. Im Gegensatz zu Indolylglycerin läßt sich mit Perjodat unter UV-Kontrolle keine Spaltung zu Indol-3-aldehyd feststellen.
Das IR-Spektrum von I_2 (Abb. 5) zeigt große Ähnlichkeit mit dem von Indolylglycerin. Besonderheiten für den 3-Substituenten lassen sich nicht entnehmen. Die Lage der Banden bei 1010-1090 cm^{-1} sprechen für Hydroxylfunktionen im Molekül.
Auch das NMR-Spektrum vermag über Anzahl und Anordnung der Hydroxylgruppen keine Aussagen zu machen, denn die OH-Pro-

tonensignale fallen mit den -NH-Protonen-Signalen zusammen.

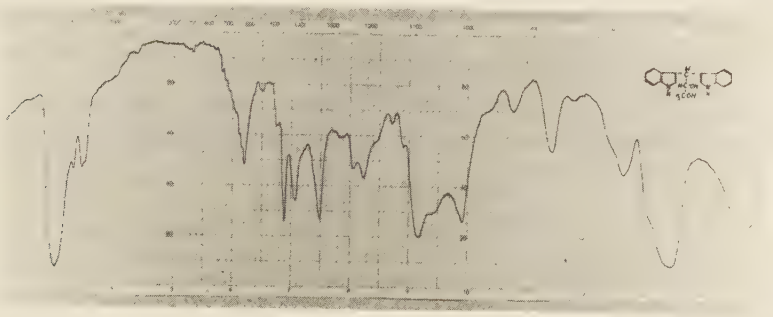


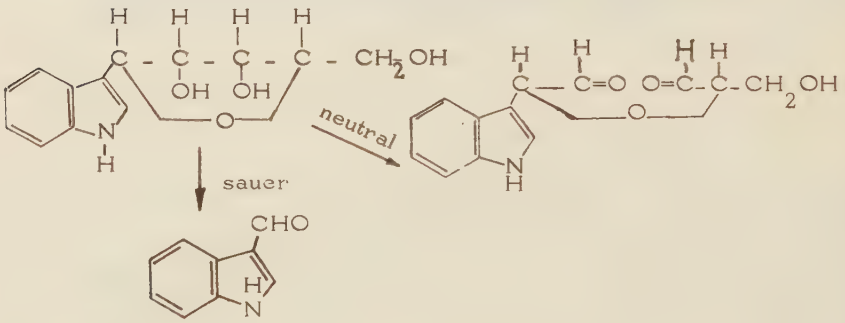
Abb. 5: IR-Spektrum von I_2

b.) Chemische Umsetzungen:

Gegen Säuren ist das Indolderivat ziemlich labil und zerfällt bzw. polymerisiert sich beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure in undefinierter Weise. Dagegen ist es gegen Alkali ziemlich resistent. 1-2 n NaOH verändert die Substanz auch bei längerem Erhitzen kaum. Mit 5 n NaOH entstehen nach 20 Stunden bei 100° C Indol und Indol-3-aldehyd neben wenig Ausgangsmaterial. Dieselben Umsetzungsprodukte treten auch auf, wenn man Indolylglycerin unter diesen Bedingungen behandelt. Außerdem entsteht bei dieser Umsetzung aus beiden Verbindungen dieselbe UV-inaktive, Perjodat/Benzidin positive Substanz, bei der es sich nach Yanofsky (88) um Methylglyoxal handelt.

Mit Natriumperjodat entsteht im essigsauren Milieu u.a. Indol-3-aldehyd, dagegen wird dieses Produkt im Gegensatz zu Indolylglycerin unter neutralen Bedingungen nicht gebildet. Unter den sauren p_H-Bedingungen bilden allerdings, wie bereits beschrieben, auch eine Reihe von 3-substituierten Indolderivaten, die in α-Stellung eine aktivierte Methylengruppe tragen, Indol-3-aldehyd. Da jedoch aus dem IR-Spektrum und aus den Reaktionen mit

Sprühreagentien nicht auf eine aktivierende -C=O-, -COOH oder -CN-Gruppierung geschlossen werden kann, wurde vermutet, daß es sich bei dem Substituenten in 3-Stellung um einen Zuckerrest in der Furanosid- oder Pyranosid-form handelt. Im sauren Milieu würde der Ring aufgehen und so der Perjodatspaltung unter Bildung von Indol-3-aldehyd zugänglich sein.

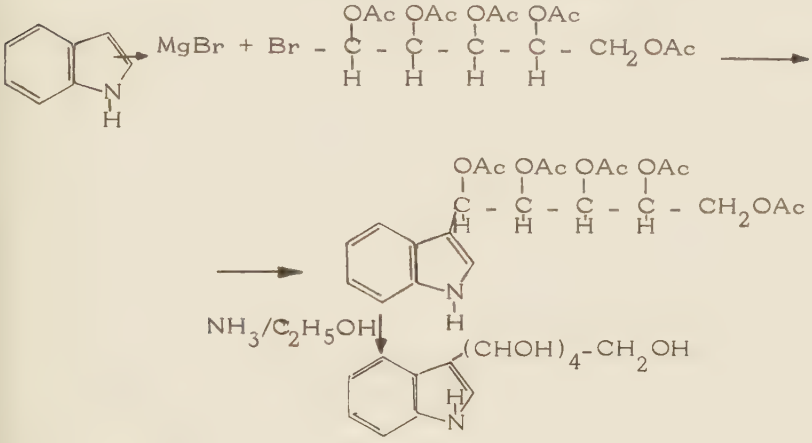


Für eine derartige Indol-Zucker-Struktur sprachen auch die positiven Reaktionen mit Zuckerreagentien. Dem Farbton nach war als Zuckerkomponente Ribose am wahrscheinlichsten.

c.) Synthese von Indolyl-3-ribit und Indolyl-3-mannit:

Es wurden Versuche unternommen, entsprechende Indolylzucker zu synthetisieren. Durch Umsetzung von Indolylmagnesiumbromid mit der Acetobromglucose bzw. der sehr labilen Acetobromribose (89) konnten die entsprechenden acetylierten Indolzucker hergestellt werden, die nach Verseifen in absolut äthanolischem Ammoniak in die entsprechenden freien Zucker überführt wurden.
Die Produkte zeigten zwar mit Perjodat dasselbe Verhalten wie I_2 und gaben auch die erwarteten Zuckernachweisreaktionen, jedoch

waren die Löslichkeitseigenschaften und das chromatographische Verhalten völlig anders als beim Indolderivat I_2.



d.) Anreicherung von I_2 über Säulenchromatographie

Wie schon anfangs kurz erwähnt, können relativ große Mengen des Indolderivates I_2 gewonnen werden, wenn man einem Hefewildstamm Indol zum Minimalmedium zusetzt. Diese lassen sich von überschüssigem Indol und anderen Verunreinigungen durch folgenden Arbeitsgang rein darstellen:

1.) Extraktion des Minimalmediums nach Abfiltrieren der Hefezellen mit Essigester.
2.) Wasserdampfdestillation der eingeengten Essigesterphase zur Abtrennung von überschüssigem Indol.
3.) Chromatographie an einer Kieselgel-H-Säule. Als Elutionsmittel dient dabei ein Gemisch aus Chloroform/Methanol/Eisessig.
4.) Neutralisieren der I_2-enthaltenden Fraktionen und erneutes Extrahieren mit Essigester.

5.) Umkristallisieren aus Benzol oder Alkohol/Aceton.

Auf diese Weise konnten etwa 100 mg Substanz gewonnen werden, die sich nach Chromatographie in verschiedenen Systemen als rein erwies. Schwach rötlich gefärbte Kristalle vom Schmelzpunkt 90-91° C.

e.) Molekulargewichtsbestimmung von I_2 und Gesamtanalyse von I_2

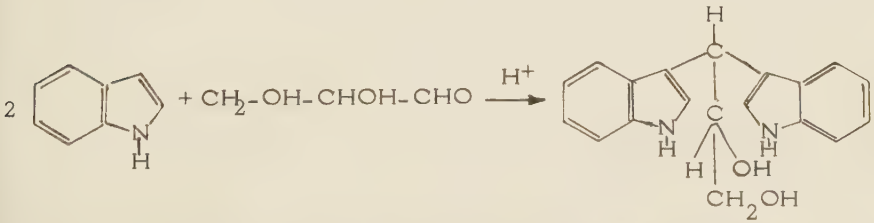
Mit der gereinigten Substanz konnte über quantitative UV-Bestimmung das Molekulargewicht nach $E = \varepsilon \cdot \frac{c}{M}$ bestimmt werden. ε ist für alle 3-substituierten Indolderivate, deren Alkylsubstituenten keinen mesomeren Effekt ausüben, nahezu gleich und schwankt nach Literaturangaben zwischen 4600-4800. Mit einem angenommenen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = 4700$ errechnete sich für I_2 ein Molekulargewicht von 167. Nach diesen Werten schieden Indolzuckerstrukturen aus. Das u.U. noch in Frage kommende Indolylglycol konnte durch Reduktion von Indolylglyoxylsäureester mit $LiAlH_4$ gewonnen werden. Das Umsetzungsprodukt stimmte jedoch nicht mit I_2 überein. Einen wichtigen Hinweis auf die Struktur des Indolderivates I_2 lieferte die Gesamtanalyse der Verbindung. Danach mußte auf 1 Stickstoffatom ein Sauerstoffatom kommen. Da die Substanz aber positiv war mit Perjodat/Benzidin und daher mindestens 2 cis-Hydroxylgruppen im Molekül vorhanden sein mußten, waren auch mindestens 2 Stickstoffatome im Molekül zu fordern. Da in der Seitenkette keine stickstoffhaltigen Funktionen nachzuweisen waren, bedeutete das, daß es sich beim Indolderivat I_2 um ein Bisindolderivat handeln müsse.

f.) Anreicherung der aktiven Komponente aus dem Minimalmedium, die zur Spontanbildung von I_2 führt

Da I_2 auch in geringer Menge spontan gebildet wird, wenn man Indol zu einem zellfreien Minimalmedium gibt, in dem vorher Hefen gewachsen waren, mußte im Minimalmedium eine Komponente enthalten sein, die mit Indol zur Bildung von I_2 führt. Durch fraktionierte Extraktion des Minimalmediums mit verschiedenen Lösungsmitteln bei verschiedenen p_H-Werten, ließ sich eine Fraktion erhalten, bei der erhöhte I_2-Bildung auftrat und die stark positiv war mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Als Hauptkomponente ließ sich in dieser Fraktion durch Papierchromatographie der freien Verbindungen, sowie der gebildeten 2,4-Dinitrophenylhydrazone Glycerinaldehyd nachweisen.

g.) Synthese von 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2

Die Umsetzung von Aldehyden mit Indol und Indolderivaten mit freier 3-Stellung unter saurer Katalyse, die zur Bildung von Bisindolderivaten führt, ist schon öfters beschrieben worden (90, 91). Bei der Kondensation von Indol mit Glycerinaldehyd müßte man zum 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 kommen:



Die Synthese dieser Verbindung wurde durchgeführt durch Umsetzung von 2 Mol Indol mit 1 Mol Glycerinaldehyddiäthylacetal

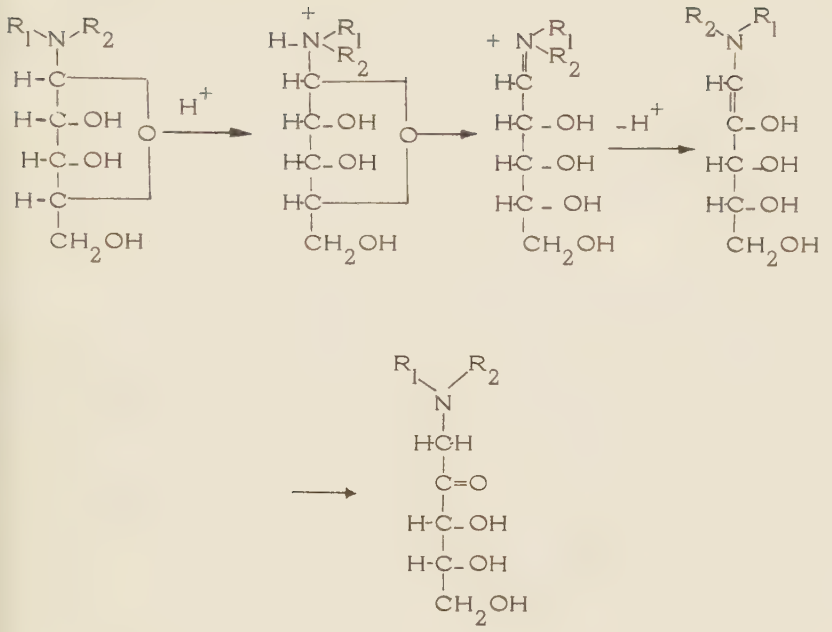
in Äthanol unter saurer Katalyse bei Zimmertemperatur. In mäßiger Ausbeute (30 %) konnte das gewünschte Produkt erhalten werden. Daneben entstehen aus dem Indol im sauren p_H-Bereich Indolpolymerisate. Eine Reinigung läßt sich auch hier nach dem oben beschriebenen Verfahren erreichen.

h.) Identität von I_2 mit 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2

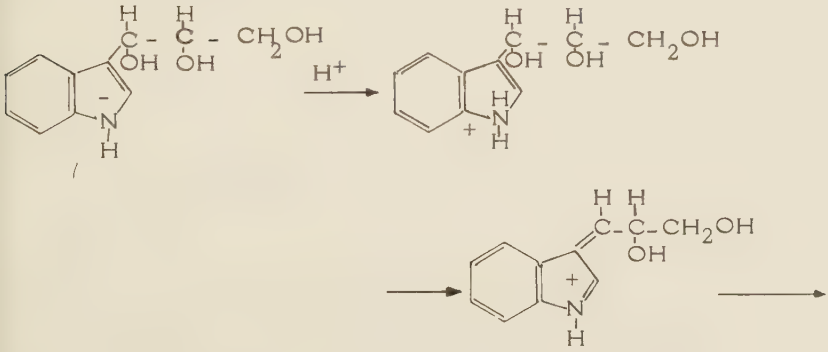
3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 erwies sich in allen Kriterien als identisch mit dem als Akkumulat erhaltenen Indolderivat I_2. Die chromatographischen Befunde stimmten ebenso exakt überein, wie die UV- und IR-Spektren der beiden Substanzen. Auch die Analyse, Schmelz- und Mischschmelzpunkt der beiden Substanzen waren völlig gleich.

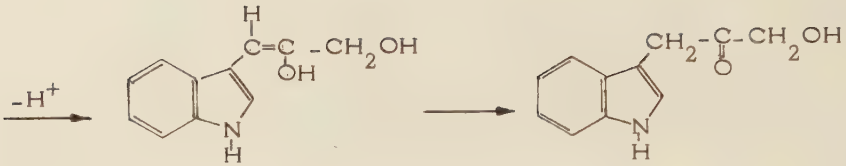
3.) Die chemische Umwandlung von Indolyl-3-glycerin in 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol und 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 und die Bildung von 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol aus 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2

Rein formal kann man sich das 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol durch eine vinyloge Amadoriumlagerung aus dem Indolyl-3-glycerin entstanden denken. Unter einer "Amadori-Umlagerung" versteht man die Isomerisierung einer 1-Amino-1-aldose zu einer 1-Amino-1-desoxy-Ketose. Von Kuhn und Weygand (92) wird folgender Mechanismus vertreten:



Micheel (93) formuliert dagegen eine Bisaminoverbindung als Zwischenprodukt. Auf unseren Fall angewendet, würde das zu einer Umwandlung von Indolyl-3-glycerin in 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol nach folgendem Mechanismus führen:





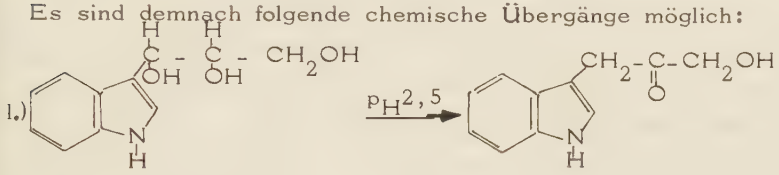
Das 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 könnte man als entsprechendes Diaminozwischenprodukt nach Micheel auffassen.
Es wurde daher versucht, eine Umwandlung von Indolylglycerin in die beiden Indolderivate zu erreichen. Dazu wurde Indolylglycerin bei verschiedenen p_H-Werten 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen und die Reaktionsansätze anschließend chromatographisch untersucht mit I_2 und I_3 als Vergleichssubstanzen.

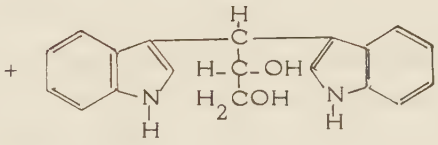
p_H 7 keine Änderung, nur Indolylglycerin nachweisbar
p_H 6 " " " " "
p_H 5 wenig undef. Produkte, in der Hauptsache Indolylglycerin
p_H 4 " " " " "
p_H 3 nur noch wenig Indolylglycerin, der Rest ist zersetzt in eine Reihe Indolderivate unter denen sich gut 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propandol nachweisen läßt.
p_H 2,5 Neben wenig unumgesetztem Indolylglycerin lassen sich sowohl 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propandol als auch 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 nachweisen.
p_H 1 Kein Indolylglycerin mehr nachweisbar. Auch kein I_2 und I_3. Undef. Produkte.

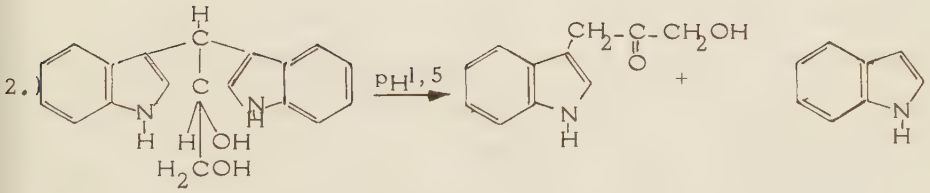
Dasselbe Experiment wurde mit Diindolylpropandiol durchgeführt, in der Hoffnung, daß sich dieses zu 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol umwandeln läßt. Läßt man dieses Indolderivat wiederum bei verschiedenen p_H-Werten zwischen p_H 7 und p_H 1 längere Zeit stehen,

so beobachtet man bei p_H 3 noch keine Umsetzung von I_2, nur bei p_H 1,5 scheint etwas 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol zu entstehen. Darauf wurde eine etwas größere Menge des Diindolylpropandiols bei p_H 1,5 12 Stunden bei 60-70° C erwärmt. Danach läßt sich u.a. 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol in größerer Menge nachweisen, außerdem entstehen etwas Indol und Indolpolymere. Ausgangsmaterial ist nur noch in Spuren vorhanden.

Es sind demnach folgende chemische Übergänge möglich:







Reaktion 1 entspricht offensichtlich einer Art Amadori-Umlagerung. Gegen die Annahme, daß das 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 ein Zwischenprodukt dieser Umlagerung sein könnte, spricht die Tatsache, daß das 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol aus dem Indolyl-3-glycerin unter milderen Bedingungen gebildet wird als aus dem Bisindolderivat.

Indolderivate mit den aufgezeigten Strukturen sind bisher noch nicht beschrieben worden. Dagegen war schon in mehreren Arbei-

ten von unbekannten Indolderivaten die Rede, die bei verschiedenen Mikroorganismen beobachtet wurden. So wurde von Eddy und Kirsop (40) über das Auftreten einer unbekannten Indolverbindung berichtet, die neben Indol Anthranilsäure und Tryptophol von einem Pyridoxinbedürftigen Hefewildstamm (NCYC 77) gebildet werden soll.

Da wir bei unseren Untersuchungen bei keiner geeignet blockierten Mutante Indol finden konnten und außerdem die Frage interessant war, ob das von Eddy beobachtete unbekannte Akkumulat unter Umständen mit einem der aufgeklärten Indolderivate identisch sei, wurde der Hefestamm NCYC 77 nochmals auf seine Akkumulatbildung hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß zwar Anthranilsäure und Tryptophol, aber kein Indol gebildet wird. Dafür traten auch hier sowohl das 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 als auch das 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol auf.
Garrick, Elberfeld und Suskind (94) fanden ebenfalls ein unbekanntes Indolderivat, als sie die Umsetzung von Indol und Glycerinaldehydphosphat mit Tryptophansynthetase von N. crassa studierten. Nach den angeführten Reaktionen hätte dieses Indolderivat durchaus identisch sein können mit 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2. Aber der für das System Isopropanol/Ammoniak/Wasser 100:25:10 angegegene R_F-Wert war völlig verschieden von dem für 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2. Da die Autoren allerdings von Glycerinaldehydphosphat als Substrat ausgingen, war zu erwarten, daß auch das eventuell auftretende 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 als Phosphorsäureester vorliegt. Wie später gezeigt werden soll, scheint diese Annahme richtig zu sein.

4.) Die biologischen Befunde bei den aufgefundenen Indolderivaten

Nachdem die Strukturen der als Akkumulate von Hefemutanten mit genetischem Block vor oder hinter dem Indol auftretenden Indolderivate als 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol und 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 aufgeklärt waren, interessierte uns die Frage, woher diese Produkte stammen und welche Bedeutung sie im biologischen Geschehen der Hefe haben.
Die Annahme, es könne sich dabei um Kunstprodukte vom primär akkumulierten Indolyl-3-glycerin handeln, das unter den schwach sauren p_H-Bedingungen der Hefe-Kulturflüssigkeit (p_H 3,5) in diese übergeht, wird schon durch die oben beschriebenen Versuche widerlegt. Bei p_H 3,5 entsteht aus dem Indolglycerin noch keines der Produkte, sondern erst bei niedrigeren unphysiologischen p_H-Werten und auch dann nur unter anderem.

a.) Wachstumswirksamkeit

Ein biologisch interessantes Ergebnis war die Beobachtung, daß 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 fütterungswirksam war für Mutanten, die auch mit Indol zum Wachstum zu bringen waren. Dagegen zeigte das 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol wie auch die vorher beschriebenen Anthranilsäureester keinerlei Wachstumswirksamkeit.
Wie gezeigt wurde, akkumulieren einige Mutanten mit Block vor dem Indol wie E 107, die mit Indol und dem Bisindolylpropandiol wachsen können, letztere Verbindung. Damit ergibt sich das eigenartige Phänomen, daß Mutanten dieses Typs ein Produkt akkumulieren, mit dem sie gleichzeitig wachsen können. In der Tat konnte gezeigt werden, daß die Mutante E 107 im Minimalmedium, in dem vorher dieselbe Mutante 3 Tage akkumuliert hatte, zum Wachstum gebracht werden kann:

	E 40	E 107	HK 51
Minimalmedium der E 107 nach 3 Tagen Akkumulation	54	46	12
Minimalmedium der HK 51 nach 3 Tagen Akkumulation	65	47	11

Tab. 5 Wachstum der E 107 mit ihrem eigenen Akkumulat. (Die Werte geben die Trübung - gemessen mit dem Lange-Photometer - nach 2 Tagen an.)

In ein Minimalmedium, dem 50 γ/ml 3,3-Düindolyl-(3)-propandiol-1,2 zugesetzt waren, wurde die Mutante E 107 eingeimpft. Nach 2-3 Tagen beobachtete man volles Wachstum. Arbeitete man nach dieser Zeit die Kulturflüssigkeit auf, so ließ sich noch keine oder nur geringe Akkumulation der normalerweise auftretenden Produkte wie Anthranilsäure und Anthranilsäureester AI und A II feststellen. Dafür wurden aber neben großen Mengen unumgesetzten Ausgangsmaterials erhebliche Mengen an 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol gebildet.

Das spricht dafür, daß die Hefe in der Lage ist, das 3,3-Di-indolyl-(3)-propandiol-1,2 in das wachstumswirksame Indol und 2-Oxo-3-indolylpropanol, das im Medium unverbraucht liegen bleibt, zu spalten. (siehe Reaktion) Dafür sprechen auch Akkumulationsversuche über verschiedene Zeiten. Während nach 1/2-stündiger Akkumulation im Medium bereits viel Diindolylpropandiol und kaum 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol nachzuweisen ist, findet man nach 5-tägiger Akkumulationsdauer praktisch nur noch 2-Oxo-3-indolyl-

(3)-propanol als Indolderivat, während vom Bisindolderivat höchstens noch Spuren nachzuweisen sind.

b.) Enzymatische Umwandlung von 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure in die Phosphorsäureester des 3,3-Diindolyl-(3)-propandiols-1,2 und des 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanols

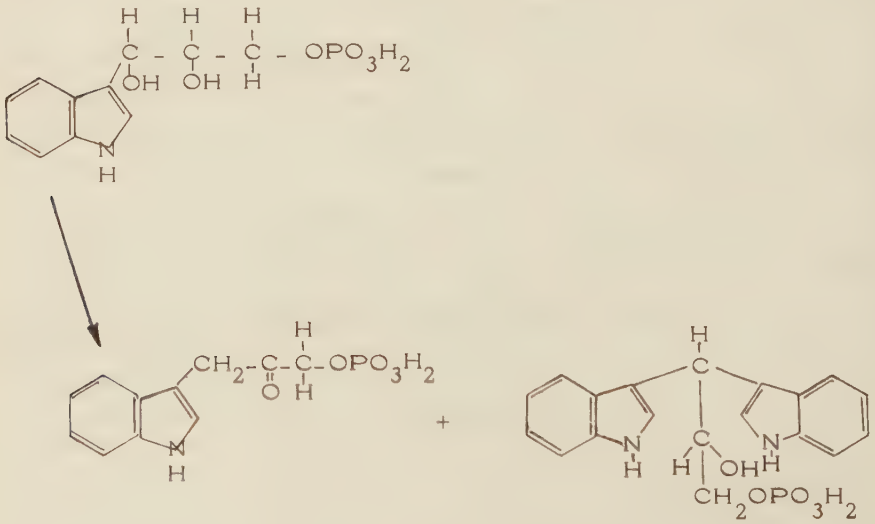
Wie bereits mehrfach erwähnt wurde, kann Indol vom Hefewildstamm in 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 umgewandelt werden. Das Auftreten dieser Komponente bei Hefemutanten mit genetischem Block hinter dem Indol läßt sich auf diese Weise erklären. Dagegen kann damit die Akkumulation dieser Bisindolkomponente bei Mutanten, die vor dem Indol blockiert sind, nicht verständlich gemacht werden. Da dieser Mutantentyp eigentlich Indol-3-glycerin akkumulieren sollte, lag der Verdacht nahe, daß die beiden Komponenten aus Indolyl-3-glycerin-phosphat gebildet werden, zumal ja auch, wie gezeigt wurde, eine chemische Umwandlung von Indolyl-3-glycerin in die beiden Indolderivate möglich ist.
Inkubierte man Indolyl-3-glycerinphosphat mit dem Enzymextrakt der Hefemutante E 107 unter geeigneten Bedingungen bei p_H 7,4 , so erhielt man nach 2-stündiger Inkubationszeit nur noch ganz wenig Indolyl-3-glycerinphosphat zurück. Der Rest war in vier nachweisbare Indolderivate umgewandelt worden.
Auf einem in Isopropanol/Ammoniak/Wasser 100:10:25 entwickelten Papierchromatogramm lagen sie bei:

R_F 0,26 (Hauptmenge)

R_F 0,4

R_F 0,75

Die beiden oberen Flecke ließen sich durch Vergleich mit den beiden bekannten Indolderivaten als 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 bzw. 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol identifizieren, wobei letzteres in sehr geringer Menge auftrat. Der R_F-Wert 0,26 stimmte recht gut mit dem von Garrick und Suskind für das unbekannte Indolderivat angegebenen Wert überein. Mit Phosphorsäurereagens (Ammoniummolybdat/Ascorbinsäure) ließ sich bei den beiden unteren Substanzflecken Phosphat nachweisen. Die Substanzflecke wurden daher aus dem Chromatogramm geschnitten und mit Phosphatase (Polidase S) behandelt. Es stellte sich heraus, daß das Indolderivat bei 0,26 nach Behandlung 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 ergab, während der Substanzfleck bei R_F= 0,4 in geringer Menge 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol lieferte.
Damit ist bewiesen, daß 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure, die ein echtes Zwischenprodukt in der Biosynthesekette des Tryptophans ist, von der Hefe in 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2-1-phosphorsäure und 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol-1-phosphorsäure umgewandelt werden kann. Gleichzeitig kann damit auch das Auftreten der beiden Indolderivate als Akkumulate bei Mutanten mit genetischem Block vor dem Indol erklärt werden.



5.) Akkumulation bei E.coli-Mutanten mit Block vor dem Indol (E.coli 1-2, 1-3, 15-169)

Nachdem die Akkumulation bei Hefemangelmutanten, die zwischen Anthranilsäure und Tryptophan blockiert sind, zu solch überraschenden Ergebnissen geführt hat, erschien es wichtig zu untersuchen, ob die einfache Annahme, daß Mutanten jeweils das Zwischenprodukt ans Medium abgeben, hinter dem sie genetisch blockiert sind, wenigstens für E.coli-Mutanten zutrifft. Zu diesem Zwecke wurden 3 Mutanten von E.coli, die alle mit Indol wachsen und bei denen als Akkumulat Indolylglycerin zu erwarten war, auf ihre Akkumulatbildung untersucht. Bei allen drei Mutanten traten relativ große Mengen an Indolylglycerin auf, während Anthranilsäure oder die bei Hefen nachgewiesenen Anthranilsäureester auch nicht in Spuren nachgewiesen werden konnten. Dagegen wurden auch hier geringe Mengen an 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 gefunden, was offensichtlich zeigt, daß auch E.coli in der Lage ist, diese Substanz zu bilden, allerdings in erheblich geringerem Ausmaß als Hefen. Der überraschendste Befund bei diesen Untersuchungen war jedoch, daß neben dem Indolylglycerin auch 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure als Akkumulat an das Medium abgegeben wird. In der Literatur wird allgemein die Auffassung vertreten, daß Phosphorsäureester nicht als Akkumulate auftreten können, da sie angeblich nicht die Zellwand passieren können. Allerdings konnten schon Weiss und Mingioli (8) Shikimisäure-5-phosphat als Akkumulat bei E.coli-Mutanten nachweisen, was zeigt, daß diese Auffassung nicht allgemein gültig sein kann. Es wurde versucht, die Akkumulation der 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure durch Zugabe von Phosphataseinhibitoren, wie Natriumfluorid und Äthylendiamintetraessigsäure, zu steigern. Diese Versuche verliefen jedoch negativ. Während Zusätze von 0,01 M NaF bis 0,02 M

NaF bzw. AEDTE keinen Effekt auf die Akkumulationsprodukte zeigte, wurde durch einen Zusatz von 0,05 M NaF die gesamte Akkumulation unterdrückt.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Verwendete Stämme:

a) Saccharomyces cerevisiae:

Wildstamm	:	S 288c
Stamm DX 12	:	genetischer Block vor Anthranilsäure
Stamm E 40	:	" "
Stamm HK 74	:	" "
Stamm HK 99	:	Tyrosinmutante
Stamm AC 39	:	"
Stamm HK 11	:	Phenylalaninmutante
Stamm E 104	:	Tyrosin/Phenylalanin-Mutante
Stamm HK 37	:	"
Stamm Kp 171	:	"
Stamm HK 51	:	Tryptophan-Mutante, Block vor Tryptophan
Stamm HK 218	:	" "
Stamm HK 163	:	" "
Stamm HK 226	:	" "
Stamm KP 10	:	" "
Stamm KP 30	:	" "
Stamm E 107	:	" Block vor Indol
Stamm AE 7	:	" "
Stamm 1071-3B	:	" "
Stamm HK 175	:	" "
Stamm HK 182	:	" "
(Stamm HK 167	:	" ")
Stamm B 6	:	" "
Stamm G 68	:	" "

Stamm H 19 : Tryptophan-Mutante, Block vor Indol
Stamm HK 145 : " "

Wildstamm S.cerevisiae NCYC 77: Benötigt Vitamin B6 zum Wachstum

Schizosaccharomyces pombe-Mutante 4//2 -p-Aminobenzoesäure-Mutante

Bäckerhefe des Handels

b) E s c h e r i c h i a coli

Wildstamm	Str. 15		
Stamm	K 68	Tryptophan-Mutante,	Block vor Anthranils.
Stamm	CP 125	"	"
Stamm	CP 1271	"	"
Stamm	1-2	"	Block vor Indol
Stamm	1-3	"	"
Stamm	15-169	"	"

c) S a l m o n e l l a typhimurium

Stamm try-8 : Tryptophan-Mutante, Block vor Anthranilsäure

B. Züchtung der Hefen und Bakterien

a) Kulturbedingungen für Hefen

Das flüssige Komplettmedium für Hefen enthält in 1 Liter deion. Wasser:

10 g Yeast - Extrakt der Firma Difco
10 g Pepton
20 g Rohrzucker oder Glucose

1 Liter Minimalmedium für Hefen enthält in 1 l dein. Wasser:

0,875 g KH_2PO_4

0,125 g K_2HPO_4

0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,1 g NaCl

0,1 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$

1,0 g $(NH_4)_2SO_4$

10,0 g Rohrzucker oder Glucose

außerdem an Spurenelementen:

500 γ H_3BO_3

40 γ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

100 γ KJ

200 γ $FeCl_3 \cdot 6H_2O$

400 γ $MnSO_4 \cdot 4H_2O$

200 γ Ammonmolybdat

400 γ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

Die Medien wurden 20 Minuten bei 1 at autoklaviert. Je 500 ml Komplettmedium, das in Literflaschen abgefüllt war, wurde mit S.cerevisiae bzw. Sch. pombe beimpft und 2 Tage bei 30° C bebrütet. Die Hefemasse wurde unter sterilen Bedingungen abzentrifugiert und zweimal mit je 10 ml Salzlösung (5,0 g NaCl und 0,12 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in 1 l deion. Wasser) gewaschen. Nach Suspension in etwas Salzlösung brachte man die Hefezellen in 500 ml steriles Minimalmedium, in dem sie 1/2 Stunde bis 3 Tage bei 30° C gehalten wurden, je nach Art des zu untersuchenden

b) Kulturbedingungen für Escherichia coli und Salmonella typhimurium

Komplettmedium:

Pro l Liter deion. Wasser: 8,0 g Nutrient Broth (Difco)
5,0 g NaCl

Minimalmedium:

Pro l Liter deion. Wasser: 3,5 g K_2HPO_4
1,5 g KH_2PO_4
0,5 g Natriumcitrat, 5,5 H_2O
0,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
1,0 g $(NH_4)_2SO_4$
1,0 g Glucose

Die Bakterienmutanten wurden 2 Tage in je 250 ml Komplettmedium und danach in 500 ml Minimalmedium 1-3 Tage bei 37° C bebrütet. Die Züchtung wurde teils unter Belüftung, teils unter halbanaeroben Bedingungen in geschlossenen Standkulturen durchgeführt.

C. Allgemeine Methoden

a) Papierchromatographie

Es wurde meist nach der aufsteigenden Methode gearbeitet. Ringchromatographie und absteigende Papierchromatographie kamen nur in Sonderfällen zur Anwendung. Die Papiere stammten von der Firma Macherey, Nagel und Co., Düren, Typen Nr. 214 und Nr. 260.

Folgende Laufsysteme kamen zur Anwendung:

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	8:1:1
Isopropanol/Ammoniak/Wasser	100:10:25
Butanol/Eisessig/Wasser (Partridge-Gemisch)	4:1:5
Butanol/Ameisensäure/Wasser	7,5:1:1
Methanol/Wasser	1:1
Benzol/Eisessig/Wasser	125:72:3
Butanol/Benzol/Methanol/Wasser	1:1:2:1
Butanol/Pyridin/5 % Trichloressigsäure	40:20:45
Lutidin/Wasser	5:2

Die Lösungsmittel wurden in destillierter Form verwendet.

b) Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Methode wurde vor allem für die Auftrennung der Indolderivate mit Erfolg angewendet. Aber auch zum Identitätsnachweis dienten u.a. mehrere Dünnschichtsysteme.

Als Plattenbelag kam ausschließlich Kieselgel in den Formen G, HF_{254} und H zur Anwendung. Während Kieselgel HF_{254} bei unbekannten Gemischen zum Sichtbarmachen aller UV-aktiven Substanzen verwendet wurde, kam Kieselgel G zur Anwendung bei der Anreicherung größerer Substanzmengen, während zur Auftrennung von Substanzen, mit denen anschließend Wachstumstests durchgeführt wurden, das gipsfreie Kieselgel H genommen wurde.

Kieselgur- und Zellulose-Schichten hatten sich für die vorliegenden Trennprobleme nicht bewährt.

Die speziellen Fließmittelsysteme waren hier:

Chloroform/Methanol/Eisessig	95:12:5
Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Methanol	50:30:20
Benzol/Methanol	95:5
Äthanol/Ammoniak	5:1
Isopropanol/Ammoncarbonatlösung (20 %)	2:1
m. gesätt. Ammoniakatmosphäre	

c) Säulenchromatographie

Kieselgel-Säulen:

Als Füllmaterial wurde ausschließlich das gipsfreie Kieselgel H verwendet. Etwa 60 g Kieselgel H wurden mit demselben Lösungsmittelgemisch, das anschließend zum Eluieren der Substanzen diente, auf die Säule aufgezogen. Um beim Eluieren vernünftige Tropfgeschwindigkeiten zu erzielen, mußte meist mit Preßluft gearbeitet werden. Zur Regenerierung der Säulenfüllung wurde zweimal mit Methanol und anschließend mit dem ursprünglichen Lösungsmittelgemisch durchgespült.

Ionenaustauscher-Säulen:

Zur Anwendung kamen:

IRA 400 Amberlite (stark basisch), MP 500 Lewatit (stark basisch) und Dowex 50 (stark sauer).

d) UV-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden mit den Modellen PMQ II (Zeiss) und RPQ 20A (Zeiss) aufgenommen. Als Lösungsmittel dienten meist dest. Methanol oder dest. Wasser.

e) IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden mit dem Leitz Infrarot Spektrographen (NaCl-Prisma 60°) aufgenommen. Wegen der geringen Substanzmengen wurden nahezu alle Spektren mit Hilfe der Mikroeinrichtung 5:1 aufgenommen.

f) Sprühreagentien

Zum Sichtbarmachen und näheren Charakterisieren der untersuchten Produkte dienten folgende Sprühreagentien:

Bromkresolpurpur	Indikator für Säuren und Basen
Rhodamin B	Indikator für Säuren
Echtblausalz B	Reagentien auf Phenole und Amine
Diazot. Sulfanilsäure	" " " " "
o-Phenylendiamin/Trichloressigsäure	Reagens für α-Ketosäuren
Eisen-(III)-chlorid-Lösung	Reagens auf phenolische und enolisierbare Substanzen
Ninhydrin	Reagens auf Aminosäuren und aliphat. Amine
Glucose/Phosphorsäure	Reagens auf aromatische Amine
p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Reagens)	Reagens auf arom. Amine und Indole in salzsaurer Lösung
Prochazka Reagens, Salkowsky Reagens	Reagentien auf Indol-3-derivate
Perjodat/Benzidin	Reagens auf cis-Diole und α-Hydroxyketone usw.
Perjodat/Schwefelsäure	Oxydationsreagens
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Ammoniak. Silbernitratlsg.	Reagentien auf reduzierende Substanzen

Anilinphthalat	Zuckerreagentien auf Aldopentosen, Aldohexosen, Ketopentosen und Ketohexosen
Disches Reagens	
Diphenylamin/Anilin/Phosphorsäure	
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Reagens auf Ketone u. Aldehyde
o-Phenylendiamin	Reagens auf Acetolstrukturen und α-Diketone

D. Isolierung der Akkumulationsprodukte

Nach Beendigung der Akkumulation wurden die jeweiligen Mikroorganismen mit Hilfe eines Membranfilters abfiltriert (Hefen) oder abzentrifugiert. Aus dem klaren Filtrat bzw. dem Überstand nach Abzentrifugieren wurden nach verschiedenen Methoden die darin enthaltenen Akkumulate angereichert:

1.) Die gesamte Kulturflüssigkeit wurde im Vakuum bei einer Badtemperatur von 50° C zur Trockene eingeengt. Der trockene Rückstand wurde anschließend mit verschiedenen Lösungsmitteln ausgezogen und die organischen Phasen auf die darin gelösten Akkumulationsprodukte untersucht. Diese Methode wurde stets dann angewandt, wenn über die Natur der auftretenden Akkumulate noch keine Aussage gemacht werden konnte oder wenn die zu erwartenden Produkte extrem wasserlöslich waren (z.B. Indolylglycerin). Der Nachteil lag darin, daß beim Ausziehen mit Methanol besonders bei Hefen auch große Mengen Glycerin und die anderen erwähnten Zuckerabbauprodukte in der organischen Phase enthalten waren, welche die anschließende chromatographische Auftrennung erheblich störten.

2.) Die Kulturflüssigkeit wurde mit verd. Salzsäure auf p_H 2,0 gebracht und mehrmals mit Essigester oder Äther extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand mit wenig Methanol aufgenommen. Diese sehr schonende Methode konnte bei den meisten der untersuchten Probleme angewandt werden. Dabei störten vor allem die in großen Mengen vorliegenden Zuckerabbauprodukte kaum, da sie nur in Spuren in die organische Phase gingen.

3.) Die gesamte Kulturflüssigkeit wurde über eine Dowex-50 Säule gegeben und die einzelnen Substanzen anschließend mit steigenden Konzentrationen an Ammoniumchlorid oder verd. Salzsäure eluiert. Dieses Verfahren hat sich jedoch überhaupt nicht bewährt und wurde deshalb auch kaum verwendet.

Die nach einem der drei angeführten Anreicherungsverfahren gewonnenen Akkumulatlösungen, die im allgemeinen ein Gemisch aus mehreren Produkten enthielten, wurden zunächst einer papierchromatographischen Auftrennung unterworfen. Als erstes wurde meist das System Isopropanol/Ammoniak/Wasser 8:1:1 ausprobiert, das sich durch sehr scharfe Trennungen oftmals besonders bewährt hat. Auf dem entwickelten Papierchromatogramm ließen sich die UV-aktiven Substanzen meist schon unter der UV-Lampe (λ = 254 nm) als löschende bzw. fluoreszierende Streifen erkennen. Außerdem wurden sie mit spezifischen Sprühreagentien sichtbar gemacht. Noch geeigneter zum Sichtbarmachen UV-aktiver Substanzflecke waren Kieselgel HF_{254}-Schichten, die mit einem unter der UV-Lampe (λ = 254 nm) gelb-grün fluoreszierenden Indikator vermischt sind: UV-aktive Substanzen lassen sich darauf selbst noch in geringer Konzentration als dunkle löschende Flecke auf hellem gelb-grün fluoreszierendem Untergrund erkennen. Soweit

möglich wurde daher zur Trennung unbekannter Substanzgemische Dünnschichtchromatographie mit diesen Schichten angewandt.

Die nach den verschiedenen Methoden sichtbar gemachten Substanzhaltigen Zonen wurden aus dem Papierchromatogramm geschnitten bzw. aus der Dünnschichtplatte ausgekratzt, mit destilliertem Methanol eluiert und meist rechromatographiert. Von den auf diese Weise gereinigten Produkten wurden die UV-Spektren aufgenommen. Diese Methode wurde auch zur Gewinnung größerer Substanzmengen, wie sie für die IR-Messung und die massenspektroskopische Untersuchung notwendig sind, herangezogen. Allerdings mußten die Substanzen, besonders wenn sie mit Methanol von Kieselgelschichten eluiert waren, noch nachbehandelt werden um brauchbare IR-Spektren zu erhalten. In Methanol lösten sich nämlich beträchtliche Mengen des Schichtmaterials, die sich bei der Aufnahme der IR-Spektren sehr störend auswirkten. Durch Einengen der methanolischen Lösung und Aufnehmen mit Äther oder Essigester ließen sich jedoch diese störenden Gelprodukte entfernen. Durch mehrmalige Wiederholung dieses Prozesses konnten die Substanzen so rein erhalten werden, daß sich davon gute Mikro-IR-Spektren anfertigen ließen. Leider war die Methode auf extrem hydrophile Substanzen nicht anzuwenden. Für derartige Produkte mußte daher die Anreicherung über sehr saubere Chromatographiepapiere erfolgen.

E. Reinigung der Porphyrine

Die nach der Essigesterextraktion des Minimalmediums erhaltene organische Phase wurde solange mit 2 n Salzsäure ausgeschüttelt, bis in der Essigesterphase unter der UV-Lampe keine Rotfluoreszenz mehr festzustellen war. Durch Zusatz von Natriumcarbonat

wurde die Salzsäure-Lösung der Porphyrine auf p_H 6,0 gebracht und mehrmals mit Essigester extrahiert. Bei diesem p_H-Wert gehen die Porphyrine wieder in die organische Phase. Anschließend wurde die Essigesterphase erneut mit 2 n Salzsäure ausgeschüttelt usw. Der Prozess wurde insgesamt dreimal wiederholt. Dabei mußte nach Möglichkeit unter Ausschluß von Tageslicht gearbeitet werden, da die Porphyrine sehr lichtempfindlich sind und sich z.T. zu anderen rotfluoreszierenden Substanzen zersetzen, die dann ein Gemisch mehrerer Porphyrine vortäuschen können. Anschließend wurde der Essigester am Rundlaufverdampfer bei 30° C abgezogen. Man erhielt das Porphyrin-Copro I - in einer schmierigen Konsistenz (ca. 2 mg aus 4 l Kulturflüssigkeit).

Hydrolyse der Porphyrinester

Die von Prof. Rimington zur Verfügung gestellten Ester von Copro I und III, sowie von Uro I und III wurden nach den beiden beschriebenen Verfahren (95) zu den freien Porphyrinen hydrolysiert:

1.) Einige µg der Ester wurden ca. 48 Stunden bei Zimmertemperatur mit 25 % Salzsäure stehengelassen. Anschließend wurde die saure Lösung bis p_H 6 neutralisiert und mit Essigester extrahiert. Bei dieser Hydrolyse mußte unter völligem Lichtausschluß gearbeitet werden, da vor allem die Coproporphyrine in der stark sauren Lösung photochemische Zersetzung zeigen.

2.) Die Hydrolyse mit 2proz. äthanolischer KOH verlief ebenfalls bei Zimmertemperatur in 20-40 Stunden oder beim Erhitzen auf 100° C in 2-3 Stunden. Nach Ablauf der Hydrolyse wurde die Reaktionslösung auf p_H 6 gebracht und mit Essigester extrahiert.

F. Untersuchungen an Verzweigungsmutanten

I Identifizierung der bei den Verzweigungsmutanten auftretenden Substanzen

a.) p-Hydroxybenzoesäure

Die Substanz wurde auf Grund gleicher R_F-Werte mit authentischer p-Hydroxybenzoesäure in verschiedenen Laufsystemen identifiziert. Als Sprühreagens wurde Echtblausalz B verwendet. Außerdem stimmte das UV-Spektrum im neutralen und alkalischen Milieu exakt mit dem von p-Hydroxybenzoesäure überein.

UV-Maxima:	neutral	250 nm
in Methanol	alkalisch	276 nm
in Cyclohexan + 10 % Äther		282 nm, 272 nm

R_F-Werte:

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	8:1:1	R_F= 0,3-0,35
"Partridge"-Gemisch	4:1:5	R_F= 0,9-0,95
Butanol/Ammoniak	1:1	R_F= 0,6
Ameisensäure/Butanol/Wasser	1:7,5:1	R_F= 0,9-0,95

b.) p-Aminobenzoesäure

Durch Besprühen mit Ehrlich's Reagens ließ sich die Substanz auf dem Chromatogramm als gelber Fleck sichtbar machen. UV-Spektrum (im neutralen und sauren Milieu gemessen) und vergleichende Papierchromatographie führten zur Identifizierung des Fleckes als p-Aminobenzoesäure.

UV-Maxima:

In Methanol	neutral	281 nm
	alkalisch	269 nm

R_F-Werte:

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	8:1:1	R_F = 0,2-0,25
Benzol/Eisessig/Wasser	125:72:3	R_F = 0,8-0,85

c) Phenylbrenztraubensäure und p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure

Phenylbrenztraubensäure lief in den meisten der angewendeten Systeme mit p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure gemeinsam. Eine gute Auftrennung erfolgte im System Benzol/Eisessig/Wasser 125:72:3 .

p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure	R_F = 0,4-0,45
Phenylbrenztraubensäure	R_F = 0,85-0,9

Mit Echtblausalz B ließen sich die beiden Substanzen sehr schön sichtbar machen. Die Identifizierung erfolgte außer durch Papierchromatographie vor allem auf Grund der charakteristischen langwelligen Verschiebung der UV-Maxima im wässrig alkalischen Milieu:

p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure	$p_H 7$: λ_{max}=283 nm
	$p_H 12$: λ_{max}=330 nm
Phenylbrenztraubensäure	$p_H 7$: λ_{max}=283 nm
	$p_H 12$: λ_{max}=323 nm

d) p-Hydroxyphenyläthanol (Tyrosol)

Das UV-Spektrum dieser Substanz (neutral 276-77 nm alk. 292 nm und 241 nm) hatte dieselben charakteristischen UV-Eigenschaften wie Phenol oder p-Hydroxyphenylalkyl-Verbindungen. Sie zeigte keine Carboxylfunktionen und reagierte mit Sprühreagentien, die

für phenolische Substanzen charakteristisch sind (Echtblausalz B, diazot. Sulfanilsäure). Das Massenspektrum der angereicherten Substanz ließ vermuten, daß es sich dabei um Tyrosol (p-Hydroxyphenyläthanol) handelt. Den endgültigen Beweis lieferte das IR-Spektrum, das mit dem von synthetisiertem Tyrosol identisch war.

Synthese von p-Hydroxyphenyläthanol (Tyrosol):

Zu einer Lösung von 1 g $LiAlH_4$ (0,026 Mol) in 20 ml absol. Äther wurden innerhalb von 1/2 Stunde 2 g p-Hydroxyphenylessigsäure (0,013 Mol) in 20 ml absol. Äther zugefügt. Das Reaktionsprodukt erhitzte man 1 Stunde unter Rückfluß. Nach dem Zersetzen des Ansatzes mit Eiswasser wurde die Lösung auf p_H 2,0 gebracht, die Ätherphase abgetrennt und die Wasserphase nochmals mit Äther extrahiert. Der Äther wurde abdestilliert. Man erhielt zunächst ein bräunliches Öl, das bald durchkristallisierte. Durch Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser entstand ein gelbliches kristallines Produkt vom Schmp. 91-92° C (Schmelzpunkt nach Lit. von biologisch gewonnener Substanz (76) 92,5° C).

e) Phenyläthanol

Das sehr bandenreiche UV-Spektrum, das dem UV-Spektrum des Benzols ähnelt, ließ vermuten, daß es sich um ein Alkylbenzol handelt. Dieselbe Substanz konnte durch Abbau von Phenylalanin als Hauptprodukt erhalten werden und dürfte demnach Phenyläthenol darstellen.

UV-Maxima (gemessen in Methanol)
neutral: 267,5 , 263 , 258 , 253 , 247 nm

Weder im sauren noch alkalischen Milieu tritt Verschiebung der Banden auf.

R_F-Werte: Isopropanol/Ammoniak/Wasser 8:1:1 R_F= 0,9-0,95
Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 R_F= 0,9

f) Chorisminsäure

Die Substanz zeigte einen R_F-Wert von 0,15-0,2 in Isopropanol/ Ammoniak/Wasser 8:1:1. Sie hat ein UV-Maximum von 274 nm (in Wasser), das sich weder im sauren noch alkalischen Milieu verändert. Mit Echtblausalz B trat auf dem Papierchromatogramm nach längerer Zeit positive Reaktion ein. Das UV-Spektrum sowie die R_F-Werte in den Systemen Benzol/Eisessig/Wasser und Butanol/ Benzol/Methanol/Wasser stimmten gut mit den von Gibson (12) für die Chorisminsäure angegebenen Daten überein. Chorisminsäure sollte durch Erhitzen in schwach saurem Milieu in p-Hydroxybenzoesäure und Phenylbrenztraubensäure zerfallen, während sie sich durch Erwärmen im neutralen und schwach alkalischen Milieu in Prephensäure umwandeln sollte.

1. Säurebehandlung:

Eine geringe Menge Substanz, die über Papierchromatographie gewonnen war, wurde mit 2 n Salzsäure versetzt und 5 Minuten unter Rückfluß gekocht. Das UV-Spektrum, dessen Maximum vorher bei 274 nm lag, änderte sich völlig und zeigte nach der Säurebehandlung zwei neue undeutliche Maxima bei 283 nm und 250 nm. Im alkalischen Milieu verschoben sie sich nach 320 nm und 278 nm. Chromatorgaphisch ließen sich im Reaktionsgemisch p-Hydroxybenzoesäure und Phenylbrenztraubensäure nachweisen.

2. Alkalibehandlung:

Der andere Teil der chromatographisch gewonnenen Substanz wurde auf dem Wasserbad 1 Stunde bei 40° C mit 0,1 n Natronlauge erwärmt. Das UV-Maximum der Chorisminsäure bei 274 nm verschwand.

Es zeigte sich nur noch ein verwaschenes UV-Spektrum mit geringer Extinktion. Beim Ansäuern trat bei 282 nm ein deutliches neues Maximum auf, das sich im alkalischen Milieu nach 318 nm verschob. Aus dem angesäuerten Reaktionsmedium ließ sich Phenylbrenztraubensäure isolieren.

g) 2,3-Dihydroxybenzoesäure

Auf Grund der blauen Fluoreszenz war diese Verbindung leicht auf dem entwickelten Papierchromatogramm festzustellen. Übereinstimmende R_F-Werte in verschiedenen Systemen mit authentischer 2,3-Dihydroxybenzoesäure, sowie das charakteristische UV-Spektrum (im neutralen und alkalischen Milieu gemessen) identifizierten die Substanz als 2,3-Dihydroxybenzoesäure.

UV-Maxima:

in Methanol	neutral:	317,5 nm und 246 nm
	alkalisch:	331 nm

R_F-Werte :

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	R_F = 0,5-0,55
"Partridge"-Gemisch	R_F = 0,8-0,85
Butanol/Benzol/Eisessig/Wasser	R_F = 0,6-0,65

h) Indolsubstanzen

Für den chromatographischen Nachweis der verschiedenen beschriebenen Indolsubstanzen eigneten sich die üblichen Papierchromatographiesysteme wenig, da die neutralen Indolderivate meist ohne Trennung mit der Front liefen. Eine sehr gute Auftrennung erzielte man dagegen über Dünnschichtchromatographie in den Systemen Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 und Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Methanol 50:30:20. Tryptophol ließ sich darin

auf Grund der R_F-Werte, sowie durch die Farbreaktionen mit verschiedenen Indol-Sprühreagentien, die mit denen von synthetischem Tryptophol gleich waren, identifizieren. Die übrigen Indolderivate konnten bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Sie entstehen, wie sich zeigen ließ, z.T. durch Abbau aus L-Tryptophan, z.T. handelte es sich um die später beschriebenen Indolderivate, die als Akkumulate bei weiter hinten blockierten Tryptophanmutanten (Indol$^-$-und Tryptophan$^-$-Mutanten) isoliert werden konnten.

II. Akkumulation unter Zusatz von Hemmstoffen

Die Mikroorganismen wurden wie üblich in Komplettmedium vorgezüchtet und anschließend in ein Minimalmedium gebracht, dem bestimmte Konzentrationen an Hemmstoff zugesetzt waren. Im Falle des 4-Methyltryptophans erwies sich bei einer Anthranilsäure akkumulierenden Hefemutante eine Gabe von 40 γ/ml 4-Methyl-DL-tryptophan als genügend, um die Akkumulation nahezu völlig zu unterdrücken. Diese Konzentration wurde deshalb auch bei den Verzweigungsmutanten angewendet, um den Tryptophanzweig zu blockieren. Beim DL-p-Fluorphenylalanin und dem m-Fluortyrosin wurden Konzentrationen zwischen 40 γ/ml und 100 γ/ml Hemmstoff durchprobiert. Nach Ablauf der üblichen Akkumulationszeit wurde nach den beschriebenen Methoden auf die akkumulierten Produkte bzw. die unter Umständen auftretenden Abbauprodukte der Hemmstoffe aufgearbeitet.

III. Umwandlung von Shikimisäure durch Hefe und Bakterien

In ein Minimalmedium, das zusätzlich noch bestimmte Mengen an Shikimisäure, bzw. Shikimisäure und Glutamin enthielt, wurden der Hefewildstamm S 288c bzw. der E.coli-Wildstamm Strain 15

eingeimpft. Nach 2-5tägigem Bebrüten bei 30° C (Hefe) bzw. 37° C (E.coli) waren die Mikroorganismen stark angewachsen und hatten dabei die zugesetzte Shikimisäure in die beschriebenen Produkte umgewandelt.

IV. Abbau der aromatischen Aminosäuren

Der Hefewildstamm S 288c wurde im Komplettmedium vorgezüchtet, steril abzentrifugiert, gewaschen und anschließend in die Minimalmedien gebracht, in denen die abzubauenden Aminosäuren in Konzentrationen von ca. 60 γ/ml enthalten waren. Nach bestimmten Zeitabschnitten wurden Proben entnommen und über UV-Kontrolle das Ausmaß des Abbaus verfolgt. Die Abnahme der zugesetzten Aminosäuren kam spätestens nach 3 Tagen zum Stillstand. Danach wurde die Kulturflüssigkeit auf die Abbauprodukte untersucht.

V. Identifizierung der Aminosäure-Abbauprodukte und der Shikimisäure-Umwandlungsprodukte

a) 3,4-Dihydroxybenzoesäure

Das Auftreten von 3,4-Dihydroxybenzoesäure war vor allem in alkalischen Systemen leicht festzustellen, da sich die Substanz hierin unter Braunfärbung etwas zersetzt. Mit Echtblausalz B reagierte sie wie alle phenolischen Substanzen. Das UV-Spektrum der Substanz ist charakteristisch und erlaubte zusammen mit den papierchromatographischen Befunden den eindeutigen Nachweis.

UV-Maxima	neutral 286 nm und 254 nm
(in Wasser)	alkalisch 305 nm

R_F-Werte:

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	8:1:1	R_F=0,05 (Zersetzung)
"Partridge"-Gemisch	4:1:5	R_F=0,8

b) p-Fluorphenyläthanol

Das papierchromatographische Verhalten folgte in allen Systemen dem von Tyrosol. Die Substanz trat als Hauptabbauprodukt des p-Fluorphenylalanins auf und zeigte keine sauren Funktionen mehr. Das UV-Spektrum zeigte, daß keine Veränderungen am Aromatenring erfolgt waren.

UV-Maxima: (in Methanol) 267 nm, 263 nm, 258 nm, 253 nm

R_F-Werte:

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	8:1:1	R_F=0,95
"Partridge"-Gemisch	4:1:5	R_F=0,9
Methanol/Wasser	1:1	R_F=0,85-0,9

c) p-Fluorbenzoesäure

Diese nur einmal als Abbauprodukt des p-Fluorphenylalanins beobachtete Substanz, fiel durch ihr kurzwelliges UV-Maximum und den positiven Nachweis auf Säurefunktionen auf. Das charakteristische UV-Maximum und vergleichende Papierchromatographie zusammen mit authentischer Substanz identifizierten dieses Abbauprodukt zu p-Fluorbenzoesäure.

UV-Maximum: (in Wasser)

neutral	229 nm	
sauer	233 nm	
alkalisch	228 nm	(Schulter)

R_F-Werte:

Isopropanol/Ammoniak/Wasser	8:1:1	R_F=0,7-0,75
"Partridge"-Gemisch	4:1:5	R_F=0,8

d) p-Fluorphenylmilchsäure

Das bei R_F= 0,6-0,65 in Isopropanol/Ammoniak/Wasser 8:1:1 beobachtete p-Fluorphenylalanin-Abbauprodukt reagierte ebenfalls sauer und zeigte keine positive Reaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin auf Ketone und Aldehyde. Das UV-Spektrum dieser Substanz glich im Gegensatz zur p-Fluorbenzoesäure noch stark dem von p-Fluorphenylalanin. Das chromatographische Verhalten dieses Produktes glich dem von p-Hydroxyphenylmilchsäure.

UV-Maxima: 270 nm, 264 nm, 259 nm (s), 254 nm (s)

(in Wasser)

R_F-Wert : Isopropanol/Ammoniak/Wasser 8:1:1 R_F=0,6-0,65

e) 4-Methyltryptophol

Die Struktur dieses einzigen nachgewiesenen Abbauproduktes des 4-Methyltryptophans wurde auf Grund entsprechender Analogien mit Tryptophol zu 4-Methyltryptophol bestimmt.

G. Untersuchungen mit Enzymrohextrakten

a) Bereitung der Enzymextrakte

Die Enzymextrakte stammten aus den S.cerevisiae-Mutanten E 107, B 6, HK 51 und aus Bäckerhefe. Die Hefemangelmutanten wurden dazu in Standkulturen vorgezüchtet und anschließend etwa 5 Stunden

in Minimalmedium gebracht, um die Bildung der Enzyme zu induzieren. Auch die Bäckerhefe wurde vor der Aufarbeitung kurze Zeit in Minimalmedium aufgeschlämmt. Anschließend wurde mehrmals mit Salzlösung gewaschen, um die an der Zellwand haftenden Akkumulate zu entfernen. Die Herstellung der Enzymextrakte erfolgte nach zwei Methoden:

1. Die frischen abzentrifugierten Hefezellen wurden in Trispuffer p_H 7,4 aufgeschlämmt und dann bei 0° C in der Vibrogenzellmühle nach W. Zillig und H. Hölzel (96) durch Glasperlen mechanisch zerstört. Die Zentrifugation in der Kühlzentrifuge bei 0° C und 15 000 x g befreite die Enzymlösung von den Zellrückständen.

2. Nach Abzentrifugieren der Hefezellen wurden diese in Trispuffer p_H 7,4 aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, während die Hefemasse bei -30° C eingefroren wurde. Diese eingefrorenen Hefezellen wurden dann zusammen mit der 1,5 - 2fachen Menge Aluminiumoxyd (Alcoa A305) im Kühlraum bei +4° C intensiv zerrieben. Nach 20-30 Minuten Reiben wurde der entstandene Zellbrei mit kaltem Trispuffer p_H 7,4 ausgezogen. Die Enzymlösung wurde wie oben von den Zellrückständen und dem Aluminiumoxyd durch Zentrifugieren bei 0° C getrennt. Die so erhaltenen Enzymrohextrakte kamen sofort nach der Bereitung zur Anwendung.

b) Enzymatische Untersuchung von N-Pyruvylanthranilsäure und N-Glutaminylanthranilsäure

Die Substrate wurden in Form ihrer Natriumsalze zugesetzt, da die freien Säuren in Wasser schlecht löslich waren.

Die Inkubationsansätze enthielten:

10 ml Enzymlösung (bereitet aus ca. 20 g feuchter Hefemasse)
2 ml Substratlösung (50 mg/10 ml bidest. Wasser)
0,2 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-Lösung (450 mg/100 ml)
0,4 ml ATP - Lösung (74 mg/10 ml)
0,2 ml DPN - Lösung (10 mg/10 ml)
20 ml Trispuffer p_H 7,4 (0,1 m Lösung)
5-10mg Yeast Extrakt (Difco)

Zur Kontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Enzymlösung angesetzt. Als Kriterium für die Aktivität der Enzyme diente die Anthranilsäurebildung aus Shikimisäure, Glutamin und Brenztraubensäure mit folgendem Inkubationsansatz:

10 ml Enzymlösung (aus 18 g feuchter Hefemasse bereitet)
1 ml Shikimisäurelösung (50 mg/10 ml)
2 ml Glutaminlösung (100 mg/100 ml)
2 ml Brenztraubensäure-Na-Salz (50 mg/50 ml)
0,2 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-Lösung
0,4 ml ATP-Lösung
0,2 ml DPN-Lösung
20 ml Trispuffer p_H 7,4
5 mg Yeast Extrakt

Die Inkubationsansätze wurden 2-3 Stunden bei 30° C gehalten. Danach wurden die Ansätze auf Anthranilsäure aufgearbeitet.

c) Hemmwirkung der Methyltryptophane auf die Anthranilsäurebildung

Zur Untersuchung der feed-back-Wirkung der verschiedenen Methyltryptophane auf die Anthranilsäurebildung, wurden dem Inkubations-

ansatz je 40 γ/ml 4-, 5- bzw. 6-Methyltryptophan zugesetzt und die jeweils gebildete Anthranilsäuremenge über Dünnschichtchromatographie und UV-Messung quantitativ bestimmt. Dazu wurde jeder Ansatz zweimal mit je 50 ml Essigester extrahiert, die Essigesterphase eingeengt und in 2 ml Methanol aufgenommen. Diese methanolische Lösung, die neben Verunreinigungen die gebildete Anthranilsäure enthielt, wurde auf Dünnschichtplatten aufgetragen und in Chloroform/Methanol/Eisessig chromatographiert. Die unter der UV-Lampe blau fluoreszierende Anthranilsäurezone wurde quantitativ von der Dünnschichtplatte ausgekratzt und mehrfach mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde eingeengt und in 2 ml Methanol aufgenommen. Durch Messung der UV-Absorption bei 330 nm wurde die Anthranilsäurekonzentration bestimmt.

Nullprobe (ohne Zusatz von Hemmstoff)	$E_{330} = 1,65$
mit 5-Methyltryptophan	$E_{330} = 0,15$
mit 6-Methyltryptophan	$E_{330} = 0,07$
mit 4-Methyltryptophan	$E_{330} = 0,035$

H. Untersuchungen an Hefemangelmutanten mit Block hinter der Anthranilsäure

I. Isolierung von 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose über Kieselgel-H-Säule

2 Liter Kulturflüssigkeit wurden nach Abfiltrieren der Hefezellen im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der feste Rückstand mußte mehrmals mit Methanol ausgezogen werden, um alle blaufluoreszierenden Anteile in die methanolische Phase zu bekommen. Nach Abdestillieren des Methanols wurde mit Wasser (100 ml) aufge-

nommen. Aus dieser wässrigen Phase ließen sich durch mehrmaliges Extrahieren mit Essigester die blaufluoreszierenden Komponenten weitgehend entfernen, während Glycerin und andere Zuckerabbauprodukte in der wässrigen Phase zurückblieben. Die Essigesterphase wurde erneut im Vakuum eingeengt und der Rückstand mit 10 ml einer Mischung von Chloroform/Methanol/Eisessig im Verhältnis 95:12:5 aufgenommen. Diese Lösung kam auf eine Kieselgel-H-Säule, die vorher mit demselben Lösungsmittelgemisch präpariert worden war. Dieses Gemisch aus Chloroform/Methanol/Eisessig diente auch als Elutionsmittel.
Es wurden ca. 50 Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen. Die Fraktionen 2-6 enthielten nur Anthranilsäure, während die Fraktionen 7-13 Mischfraktionen aus Anthranilsäure und steigenden Mengen an Amadori-Produkt darstellten. In den Fraktionen 14-23 war die 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose rein enthalten. Diese Fraktionen wurden durch Schütteln mit Natriumcarbonatlösung neutralisiert, die Chloroformphase abgetrennt und die wässrige Phase mehrmals mit Essigester extrahiert. Nach Einengen der organischen Phasen im Vakuum erhielt man 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose in reiner Form als kristalline gelbliche Nadeln.

II. Untersuchung der Anthranilsäureester A I und A II

a) Behandlung von A I und A II mit Säure

Chromatographisch gereinigte Mengen der beiden Substanzen wurden mit 25 proz. Salzsäure 15 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Chromatographie in Isopropanol/Ammoniak ließ sich in beiden Reaktionsansätzen Anthranilsäure nachweisen. Auf dem Papierchromatogramm mit dem Reaktionsansatz von A I ließen sich außerdem noch 2 UV-inaktive Substanzflecke mit Perjodat/Ben-

zidin bei R_F 0,4 und 0,53 erkennen. Der Fleck bei R_F 0,53 war außerdem positiv mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. An dieser Stelle lag auch in dem System Glycolaldehyd. Bei A II trat mehr Anthranilsäure auf als bei A I, wo noch größere Mengen an Ausgangsmaterial nachzuweisen waren.

b) Spaltung von A I mit Natriumäthylat in abs. Äthanol

Während nach 3stündiger Behandlung von A I mit Natriumäthylat in absolutem Alkohol bei 80° C kaum eine Umsetzung zu beobachten war, führte die Umsetzung nach 25 Stunden zur Bildung von Anthranilsäure und einem zweiten blaufluoreszierenden Fleck bei R_F 0,75 in Isopropanol/Ammoniak, der nach vergleichender Chromatographie Anthranilsäureäthylester darstellen dürfte. Dieses Produkt war aus A I offensichtlich durch Umesterung entstanden. Ließ man den gesamten Reaktionsansatz mit 25 proz. Salzsäure 2 Tage stehen, so war nur noch Anthranilsäure nachzuweisen.

c) Reduktion von A I mit $LiAlH_4$

Eine kleine Menge chromatographisch abgetrennter Substanz in abs. Äther wurde zu einem Überschuß (50 mg) $LiAlH_4$ in Äther zugegeben. Die Reaktionslösung wurde kurz erwärmt und nach Abkühlen mit Eiswasser zersetzt. In der Ätherphase ließen sich zwei UV-aktive Substanzen nachweisen, deren UV-Eigenschaften sich weder mit Anthranilsäure- noch Indol-Derivaten vereinbaren ließen.

d) Enzymatische Untersuchungen an A I

Um die Frage zu klären, woher die Anthranilsäureester stammen, wurde die Bildung von A I enzymatisch untersucht. Während sich 1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose nicht in die Anthranilsäureester umwandeln ließ, konnten durch Umsetzung von Anthranil-

säure mit Ribose-5-phosphat geringe Mengen beider Anthranilsäureester nachgewiesen werden, wenn man die beiden Substrate mit dem Enzymextrakt der Hefemutante E 107 inkubierte. Spuren der Anthranilsäureester konnten auch bei der oben angeführten enzymatischen Bildung der Anthranilsäure gefunden werden. Dagegen ließ sich der isolierte Anthranilsäureester A I enzymatisch nicht mehr weiter umwandeln.

e) Wachstumstest mit den Anthranilsäureestern

An einer Hefemangelmutante E 40, die mit Anthranilsäure wächst und an einer ebenso blockierten Salmonella typhimurium-Mutante (try 8) wurden die beiden Anthranilsäureester auf ihre Wachstumseigenschaften getestet. Zu diesem Zweck wurden die Substanzen chromatographisch getrennt, die entsprechenden Zonen aus dem Papierchromatogramm geschnitten, eluiert und erneut chromatographiert. Die so erhaltenen zweifach chromatographisch gereinigten Anthranilsäureesterzonen wurden in Streifen geschnitten und unter möglichst sterilen Bedingungen in steriles Minimalmedium gegeben. Dahinein wurde die Mutante überimpft. Das Wachstum wurde auf Grund der auftretenden Trübung mit dem Lange-Photometer gemessen.

Substanz	Mutante E 40	try 8	E 107
Anthranilsäure-ester A I	11	10	9
Anthranilsäure-ester A II	15	16	10
Anthranilsäure	48	39	11

Die Werte geben die Trübung nach 2 Tagen an.
Das geringe Wachstum mit dem Anthranilsäureester A II dürfte auf den leichteren Zerfall von A II in Anthranilsäure, mit der die beiden Mutanten E 40 und try 8 wachsen können, zurückzuführen sein.

III. Versuche zur Synthese eines Anthranilsäure-Glycolaldehyd-esters als Modellsubstanz für A I

a) Herstellung des Silbersalzes der o-Nitrobenzoesäure

10 g (0,07 Mol) o-Nitrobenzoesäure wurden in 100 ml Wasser aufgeschlämmt und unter leichtem Erwärmen und Umschütteln soviel Ammoniak zugefügt, daß sich die o-Nitrobenzoesäure unter Bildung des Ammoniumsalzes gerade löste. Zu der klaren Lösung wurden 10 g (0,07 Mol) Silbernitrat- gelöst in 20 ml Wasser - allmählich zugegeben. Es fällt ein hellgelber Niederschlag aus. Dieser wird abgesaugt und mit Eiswasser und Äther gewaschen.

b) Umsetzung des Silbersalzes der o-Nitrobenzoesäure mit Bromacetaldehyddimethylacetal

10 g (0,04 Mol) des Silbersalzes der o-Nitrobenzoesäure wurden zusammen mit 6,15 g (0,04 Mol) in absolutem Dioxan 48 Stunden unter Rückfluß gekocht. Es schied sich ein Silberspiegel ab. Im Reaktionsgemisch ließen sich chromatographisch neben relativ großen Mengen an freier o-Nitrobenzoesäure Umsetzungsprodukte in erheblich geringerer Konzentration nachweisen. Die Reaktionslösung wurde mit Sodalösung auf p_H 8,0 gebracht und dreimal mit Äther extrahiert. Nach Abdestillieren des Äthers blieb wenig öliger Rückstand übrig, der auch nach längerer Zeit nicht zur Kristal-

lisation gebracht werden konnte. In Benzol/Methanol 95:5 ließen sich dünnschichtchromatographisch 4 Reaktionsprodukte in unterschiedlicher Konzentration nachweisen. Über eine Kieselgel-H-Säule konnten die vier Produkte weitgehend getrennt werden, wobei Benzol/Methanol 95:5 als Elutionsmittel diente.

c) Reduktion der Reaktionsprodukte mit H_2/Pt

In einer Hydrierapparatur wurden ca. 3 mg Platinoxyd in Essigester vorhydriert. Nach Zugabe der chromatographisch getrennten Reaktionsprodukte war bei allen 4 Komponenten eine rasche Wasserstoffaufnahme zu beobachten. Zwei der reduzierten Umsetzungsprodukte zeigten eine intensive Blaufluoreszenz unter der UV-Lampe nach Reduktion, während die beiden anderen Komponenten zwar positive Reaktionen auf Aminogruppen mit Ehrlich's Reagens gaben, aber nicht fluoreszierten. Die beiden erstgenannten Reaktionsprodukte erwiesen sich auch nach UV- und IR-Spektrum als Anthranilsäureester, während die beiden anderen Komponenten völlig abnormale UV-Spektren lieferten. Zwischen den beiden Anthranilsäureestern war mit Osmiumtetroxyd eine Unterscheidung zu treffen. Während die eine blaufluoreszierende Komponente mit OsO_4 unter Schwarzfärbung reagierte, was auf das Vorhandensein einer Doppelbindung in der Alkoholkomponente schließen ließ, zeigte der andere Anthranilsäureester keine Reaktion mit OsO_4 und dürfte wohl das gewünschte Umsetzungsprodukt darstellen.

d) Acetalspaltung mit Salzsäure

1. Dieser Anthranilsäureester wurde zur Hydrolyse der Acetalgruppe 1/4 Stunde unter Rückfluß mit 2 proz. Salzsäure gekocht. Es entsteht in der Hauptsache Anthranilsäure neben Spuren einer

zweiten blaufluoreszierenden Komponente.

2. Ließ man den Anthranilsäureester dagegen mehrere Stunden bei 0° C mit 2 n Salzsäure stehen, so ließ sich neben Ausgangssubstanz und wenig Anthranilsäure in höherer Konzentration eine neue blaufluoreszierende Substanz nachweisen, die ein UV-Spektrum mit einem Maximum von 320 nm in neutralem Milieu (in Methanol gemessen) hatte, während es sich im sauren Milieu unter Erniedrigung der Extinktion nach kürzeren Wellenlängen verschob. Das erhaltene Produkt stimmte weder chromatographisch noch spektroskopisch mit dem als Akkumulat erhaltenen Anthranilsäureester A I überein, was auch nicht zu erwarten war.

IV. Isolierung und Strukturaufklärung der Indolderivate

a) Isolierung der Indolderivate

1. Die Indolderivate I_1, I_2 und I_3 wurden durch Extraktion des von den Hefezellen befreiten Minimalmediums mit Essigester und anschließender Trennung über Dünnschichtchromatographie im System Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 auf Kieselgel HF_{254}-Platten gewonnen. Die unter der UV-Lampe (λ = 254 nm) sichtbaren scharfgetrennten Substanzzonen wurden einzeln von der Dünnschichtplatte gekratzt und mit dest. Methanol eluiert. Auf diese Weise erhielt man von jedem Indolderivat genügend Material, um die weiteren Untersuchungen durchzuführen.

2. Das Indolderivat I_2 ließ sich durch Umwandlung von Indol mittels Hefe gewinnen. Dazu wurden dem Minimalmedium ca. 50 γ/ml Indol zugesetzt und zu je 500 ml dieses Mediums ca. 3-5 g käuflicher Bäckerhefe oder Wildstammhefe (S 288c) zugefügt. Nach 2 Tagen wurde das entstandene Indolderivat I_2 isoliert. Die Hefen

wurden abfiltriert und die Kulturflüssigkeit mehrmals mit Essigester extrahiert. Nach Abdestillieren des Essigesters im Vakuum erhielt man eine schmierige bräunliche Masse, in der neben relativ großen Mengen des gewünschten Indolderivates I_2 noch viel Indol und kleinere Mengen verschiedener Indolpolymerisate und -kondensate vorhanden waren. Dieses Gemisch wurde mit ca. 200 ml Wasser aufgeschlämmt und das Wasser unter Vakuum wieder abgezogen. Dabei geht der größte Teil des wasserdampfflüchtigen Indols mit. Mehrmalige Wiederholung dieses Prozesses entfernte das Indol fast vollständig. Der Rückstand wurde mit 20 ml einer Mischung aus Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 aufgenommen und auf eine Kieselgel-H-Säule gebracht. Als Elutionsmittel diente dasselbe Lösungsmittelgemisch. Fraktionen zu je 10 ml wurden mit Hilfe eines Fraktionsammlers aufgefangen. Die ersten Fraktionen enthielten das restliche Indol und Indolpolymerisate, die folgenden 5-8 Fraktionen stellten Mischfraktionen der obigen Produkte und des Indolderivates I_2 dar, während in den nächsten Röhrchen praktisch reine Lösungen von I_2 vorlagen. Diese letzten Fraktionen wurden vereinigt und mehrmals mit Sodalösung zur Neutralisierung des Eisessigs geschüttelt. Die abgetrennte Chloroformphase wurde im Vakuum eingeengt. Als Rückstand erhielt man eine schwach gelbe kristalline Masse (ca. 200 mg aus 4 l Minimalmedium + Indol) Fp. 80 - 85° C. Nach Umkristallisieren aus Benzol entstanden daraus schwach rötlich gefärbte Kristalle. Fp. 90-92° C. (100 mg Ausbeute). Nach Chromatographie stellten sie ein einheitliches Produkt dar.

Analyse:	Ber.	C 74,49	H 5,92	O 10,45
	Gef.	C 74,31	H 5,85	O 10,22

Einw. : 3,402 mg 9,260 mg CO_2, 1,770 mg H_2O

Einw. : 2,974 mg 0,949 mg J_2

b) Chemische Umsetzungen mit Indolderivat I_3

1. Spaltung mit Natriumperjodat

Ungefähr 2 mg der Substanz in 5 ml Wasser gelöst, wurden mit 5 Tropfen Eisessig angesäuert und mit 2 ml 1n Natriumperjodatlösung versetzt. Das Reaktionsgemisch ließ man 5 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wurde mit Essigester extrahiert und die organische Phase chromatographiert. Man erhielt in den Systemen Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 und Chloroform/Tetrachlorkohlenstoff/Methanol 50:30:20 je zwei Indolflecke, von denen der schneller laufende positiv mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin war und mit Indol-3-aldehyd identisch war. Der in höherer Konzentration auftretende langsamer laufende Fleck reagierte sauer und erwies sich als Indolylessigsäure.

2. Reduktion mit $LiAlH_4$

Ca. 2 mg über Dünnschichtchromatographie gewonnener Substanz wurden in 10 ml absolutem Äther gelöst. Die Lösung wurde zu einer Suspension von 100 mg $LiAlH_4$ in 10 ml absolutem Äther getropft. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch 1 Stunde unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Zersetzen des Ansatzes mit Eiswasser wurde die Ätherphase abgetrennt, die wässrige Phase erneut mit Äther extrahiert und die beiden Ätherphasen vereinigt. Nach Abdestillieren des Äthers erhielt man ca. 1,5 mg schwach gelb gefärbtes Umsetzungsprodukt Fp. 94°-95° C, das sich als 3-Indolyl-(3)-propandiol-(1,2) erwies. Fp nach Literatur: 97-98° C. Mischschmelzpunkt 94-95° C.

3. Synthese von 3-Indolyl-(3)-propandiol-1,2

Eine Lösung von 1,3 g 3-Allylindol und 2 ml Pyridin in 20 ml Äther wurde auf -30° C gekühlt und zu einer Lösung von 2 g Osmiumtetroxyd in 200 ml Äther von ebenfalls -30° C, gegeben. Die Reaktionslösung wurde langsam innerhalb 1 Stunde auf 15° C gebracht. Während dieser Zeit schied sich der Additionskomplex als bräunlicher fester Niederschlag ab. Dieser wurde in 35 ml Chloroform gelöst und mit 30 g Mannit, gelöst in 300 ml Wasser, das 3 g Kaliumhydroxyd enthielt, 10 Minuten kräftig geschüttelt. Die Chloroform-Phase wurde verworfen und die Wasserphase 24 Stunden mit dem Extraktionsgerät nach Kutscher und Steudel kontinuierlich mit Äther ausgezogen. Nach Abdestillieren des Äthers erhielt man eine gummiartige Masse, die rasch erstarrte. Diese wurde zweimal mit 10 ml Portionen Äther-Petroläther 1:1 behandelt. Auf diese Weise erhielt man eine leicht gefärbte, körnige Substanz (1,3 g, 80 % d.Th.) Fp. 93-97° C. Nach Umkristallisieren aus Benzol erhielt man gelbliche Plättchen. Fp. 97° C (Lit. 97-98° C)

c) Untersuchung des Indolderivates I_2

1. Quantitative Bestimmung der I_2-Bildung mit und ohne Hefezellen

Mit Hefezellen: In 2 je 500 ml Minimalmedium wurden 0,2 g Indol und 5 g Bäckerhefe des Handels gegeben. Zwei derartige Ansätze wurden genau 48 Stunden bei 30° C inkubiert. Danach wurden die Hefezellen abfiltriert und die Kulturflüssigkeiten jeweils einmal mit 100 ml und zweimal mit 50 ml Essigester extrahiert. Der Essigester wurde abdestilliert und der Rückstand quantitativ mit Methanol

in 20 ml Meßkolben gebracht. Davon wurde 1 ml auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und im System Chloroform/Methanol/Eisessig getrennt. Die I_2-Zone wurde quantitativ von der Dünnschichtplatte ausgekratzt, mehrmals mit Methanol eluiert und dieses anschließend im Vakuum abgezogen. Das zurückbleibende I_2 wurde in 2 ml Methanol gelöst und der Gehalt an I_2 quantitativ mit Hilfe der Differenz der Extinktionen bei 282 nm (Maximum) und 320 nm (Korrektur des Nullwertes) bestimmt. Man erhielt für die beiden Ansätze die Werte:

$$E_{282} - E_{320} = 7,04 \text{ und } E_{282} - E_{320} = 6,80$$

I_2-Bildung ohne Hefezellen:

Zu je 500 ml Minimalmedium wurden 5 g Bäckerhefe gegeben. Die beiden Ansätze blieben ebenfalls genau 48 Stunden bei 30° C stehen. Danach wurden die Hefezellen unter sterilen Bedingungen abfiltriert und den von den Hefezellen befreiten Minimalmedien je 0,2 g Indol zugesetzt. Diese Ansätze ließ man nochmals bei 30° C zwei Tage lang stehen. Anschließend wurde wie oben auf I_2 aufgearbeitet und die gebildete Menge ebenso quantitativ bestimmt. Dabei erhielt man die Werte:

$$E_{282} - E_{320} = 0,89 \text{ und } E_{282} - E_{320} = 0,95$$

2) Molekulargewichtsbestimmung von Indolderivat I_2

ε-Bestimmungen bekannter Indol-3-derivate:

Indolyl-(3)-propandiol-1,2:

Einwaage	$C_1 = 0,048$ g/l	$C_2 = 0,049$ g/l
gemessene Extinktion bei 282 nm	$E_1 = 1,2$	$E_2 = 1,22$

Molekulargewicht	M = 191	M = 191
berechneter Extinktionskoeffizient	ε_1 = 4770	ε_2 = 4770

Indolyl-3-glycerin:

Einwaage:	C_1 = 0,05 g/l	C_2 = 0,056 g/l
gemessene Extinktion bei 282 nm	E_1 = 1,125	E_2 = 1,2
Molekulargewicht	M = 207	M = 207
berechneter Extinktionskoeffizient	ε_1 = 4660	ε_2 = 4650

Für das unbekannte Indolderivat I_2 wurde der Durchschnittswert von ε = 4700 eingesetzt: $M = \frac{\varepsilon \cdot c}{E}$

Einwaagen:	C_1 = 0,042 g/l	C_2 = 0,07 g/l	C_3=0,046 g/l
gemessene Extinktion bei 282 nm	E_1 = 1,10	E_2 = 1,98	E_3= 1,13
eingesetztes ε	4700		
berechnetes Molekulargewicht	M_1 = 169	M_2 = 167	M_3= 165

3) Chemische Umsetzungen mit dem Indolderivat I_2

Behandlung mit Alkali:

10 mg der gereinigten Substanz wurden zu 20 ml 2 n Natronlauge gegeben und 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die dünnschicht-

chromatographische Untersuchung des Reaktionsgemisches ergab, daß fast keine Umsetzung stattgefunden hat.
Darauf wurde die Substanz mit 10 proz. Kaliumhydroxydlösung 24 Stunden bei 100° C erhitzt. Die Reaktionslösung färbte sich intensiv braun. Im Reaktionsgemisch ließen sich neben wenig unumgesetztem Ausgangsmaterial Indol und Indol-3-aldehyd neben undefinierten Zersetzungsprodukten nachweisen. Nach Chromatographie des Reaktionsgemisches in Isopropanol/Ammoniak konnte bei R_F=0,15 mit Perjodat/Benzidin ein Substanzfleck nachgewiesen werden, der UV-inaktiv ist und auch auftritt, wenn man Indolylglycerin unter denselben alkalischen Bedingungen behandelt.

Behandlung mit Natriumperjodat:

2 mg des Indolderivates I_2 wurden mit 5 ml 1 n Natriumperjodatlösung versetzt und 10 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es trat eine geringe Verfärbung des Reaktionsgemisches ein. Es ließ sich chromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr, aber auch kein Indol-3-aldehyd nachweisen. Das auftretende Spaltungsprodukt bei R_F 0,9 in Chloroform/Methanol/Eisessig konnte nicht identifiziert werden. Fügt man dem obigen Reaktionsansatz 4-5 Tropfen 10 proz. Schwefelsäure zu, so färbt sich die Lösung intensiv rot.
Nach 4-stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur ließ sich im Reaktionsgemisch neben dem oben auftretenden Zersetzungsprodukt und anderen nicht identifizierten Flecken mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, sowie mit Hilfe des UV-Spektrums Indol-3-aldehyd als Reaktionsprodukt gut nachweisen.

Behandlung mit Säure:

Bei Zugabe von 5 proz. Salzsäure färbte sich die Lösung des Indolderivates nach kurzem Stehen an der Luft rötlich. Bei kurzzeitigem Erhitzen erhält man ein dunkelbraunes Reaktionsgemisch, aus dem sich jedoch keine bekannten Indolverbindungen isolieren ließen.

4) Darstellung von Indolyl-3-mannit

Zu 0,27 g (0,011 Mol) Magnesium in 10 ml absolutem Äther fügte man unter Rühren tropfenweise 1,2 g (0,011 Mol) Äthylbromid in 5 ml Äther. Nach Beendigung der Reaktion tropfte man dazu eine Lösung von 1 g (0,009 Mol) Indol in 5 ml absol. Benzol. Nach 1-stündigem Rühren des Reaktionsgemisches gab man dazu in kleinen Portionen eine Lösung von 2 g Acetobromglucose in 10 ml Äther. Man rührte 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Danach wurde das Reaktionsgemisch durch Eingießen in Eiswasser zersetzt. Nach Abtrennen der Ätherphase wurde die wässrige Phase nochmals mit Äther extrahiert. Die beiden intensiv rot gefärbten Ätherphasen wurden vereinigt. Nach Abdestillieren des Äthers erhielt man ein dunkelrotes Öl, das nach einem Tag noch nicht erstarrte. Dieses Öl wurde mit Petroläther/Äther-Gemisch 1:1 behandelt. Der noch dunkel gefärbte ölige Rückstand wurde durch Stehenlassen in absolut äthanolischem Ammoniak (14 Stunden) entacetyliert.

Durch Behandeln mit heißem Benzol ließ sich das überschüssige Indol herauslösen. Zurück blieb eine zähe braune Masse (0,6 g 30 % d.Theorie), die sich nicht zur Kristallisation bringen ließ. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Produktes im System Chloroform/Methanol/Eisessig ergab, daß neben geringen, schneller wandernden Verunreinigungen das Reaktionsprodukt am Start blieb. Dieses hatte das zu erwartende UV-Spektrum (290 nm, 282 nm, 274 nm (s), 224 nm), zeigte positive Reaktionen mit allen Zuckerreagentien und ließ sich mit Perjodat in neutralem Milieu zu Indol-3-aldehyd spalten. Da das Indolyl-3-mannit nur zu Vergleichszwecken gebraucht wurde, konnte auf weitere Reinigung des Produktes verzichtet werden.

5) Darstellung von Indolyl-3-ribit

Wie oben wurde Indolylmagnesiumbromid hergestellt und dazu ca. 2 g unreiner frisch bereiteter Acetobromribose in abs. Benzol portionsweise zugefügt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei Indolyl-3-mannit beschrieben. Man erhielt jedoch hierbei das gewünschte Umsetzungsprodukt nur in sehr geringer Ausbeute (~5 %). Es zeigte auf der Dünnschichtplatte positive Reaktionen auf Pentosen mit Dische und Anilinphtalat und ließ sich ebenfalls zu Indol-3-aldehyd spalten. Der R_F-Wert in Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 des Umsetzungsproduktes war auch hier R_F= 0,0.

UV-Maxima: 290 nm, 281 nm, 273 nm (s), 223 nm

6) Reduktion von Indolylglyoxalsäuremethylester mit $LiAlH_4$

Zu einer Lösung von 1 g (0,026 Mol) $LiAlH_4$ in 20 ml absolutem Äther wurden langsam unter Kühlung eine Lösung von 2 g (0,0068 Mol) Indolylglyoxalsäuremethylester in 20 ml absolutem Äther zugefügt. Nach 10-stündigem Rühren bei 0° C wurde das Reaktionsgemisch mit Eiswasser zersetzt, die Ätherphase abgetrennt und der Äther abgezogen. Zurück blieb ein bräunlich öliges Produkt, das nach einiger Zeit erstarrte. Das Hauptprodukt, das sich durch seine positive Reaktion mit Perjodat/Benzidin, sowie seine leichte Spaltung mit Perjodat zu Indol-3-aldehyd als Indolylglycol auswies, fand sich im Dünnschichtsystem Chloroform/Methanol/Eisessig bei R_F = 0,75 und war damit nicht mit dem untersuchten Indolderivat I_2 identisch.

7) Darstellung von 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2

Eine Lösung von 1,64 g (0,01 Mol) Glycerinaldehyddimethylacetal in 10 ml Äthanol wurde zu einer Lösung von 2,34 g (0,02 Mol)

Indol, gelöst in 20 ml Äthanol, gegeben. Zu der Mischung fügte man 0,5 ml konz. Salzsäure. Den Reaktionsansatz ließ man 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, wobei er sich rötlich bis bräunlich färbte. Anschließend zersetzte man das Reaktionsgemisch mit 100 ml 10 proz. Kaliumhydroxydlösung. Es schied sich ein braunes Öl ab. Dieses Öl, das neben dem gewünschten Umsetzungsprodukt noch erhebliche Mengen an Indol und Polyindolen enthielt, wurde nach der für I_2 beschriebenen Methode durch Wasserdampfdestillation und Säulenchromatographie gereinigt. Man erhielt so 500 mg ziemlich reiner Substanz (15 % d.Th.), die durch Umkristallisieren leicht gelb gefärbte Kristalle ergab. Fp. 90-91° C.

UV-Maxima: 290 nm, 282 nm, (ε ca. 4600 in MeOH), 221 nm
IR-Spektrum: Banden bei 3350, 1440-1320, 1100-1000, 870 und 740 cm^{-1}

$C_{19}\ H_{18}\ N_2\ O_2$ (306)

Ber.	C 74,49	H 5,92	O 10,45
Gef.	C 74,23	H 5,83	O 10,20

Einw. 4,205 mg, 11,425 mg CO_2 2,190 mg H_2O

Einw. 2,980 mg 0,959 mg J_2

d.) Chemische Umwandlung von Indolyl-3-glycerin in 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 und 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol

Je 2 mg synthetisches Indolylglycerin wurden jeweils in 5 ml Wasser gelöst. Mit 0,1 n bzw. 1 n Schwefelsäure wurden diese Lösungen auf die p_H-Werte p_H 1 bis p_H 7 jeweils in 0,5 p_H-Intervallen eingestellt. Die Kölbchen blieben 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen.

Die Untersuchung auf entstandene Reaktionsprodukte erfolgte dünnschichtchromatographisch mit den beiden Indolderivaten I_2 und I_3 als Vergleichssubstanzen. Während die Ansätze mit p_H 7, p_H 6 und p_H 5 noch keine Verfärbung zeigten, war bei den anderen eine steigende Braunfärbung mit fallendem p_H-Wert festzustellen. Im Ansatz p_H 2,5 ließen sich gut 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 und 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol nachweisen. 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol konnte auch in geringer Konzentration bei p_H 3,5 und p_H 3 gefunden werden, dagegen nicht das andere Indolderivat.

d) Umwandlung von 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 in 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol

Je 2-3 mg synthetisiertes 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 wurden in je 10 ml Wasser gelöst und die Lösungen mit 0,1 n bzw. 1 n Schwefelsäure auf die p_H-Werte 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6 und 7 gebracht. Nach 3 Tagen wurden die Ansätze auf u.U. entstandenes 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol durch Chromatographie auf Kieselgel HF_{254}-Platten im Dünnschichtsystem Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 untersucht. Bei den p_H-Werten 5-7 ließen sich überhaupt keine Umsetzungen feststellen. Auch die anderen zeigten mit Ausnahme von p_H 1 und 1,5 noch immer große Mengen an Ausgangsmaterial.
Bei p_H 1,5 war etwas 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol nachzuweisen. Darauf wurden 10 mg 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 bei p_H 1,5 (H_2SO_4) 12 Stunden auf 70° C erwärmt. Dieser Reaktionsansatz enthielt größere Mengen an 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol, das durch vergleichende Dünnschichtchromatographie, sowie mit Ehrlich's Reagens, 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Prochazka Reagens, ammoniakal. Silbernitratlösung und TTC eindeutig nachgewiesen wurde. Daneben trat bei R_F=1,0 offensichtlich etwas Indol auf.

V. Biologische Befunde bei den Indolderivaten

a) Wachstumstest

1.) mit den isolierten Indolderivaten

Das Akkumulatgemisch wurde dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel H-Platten im System Chloroform/Methanol/Eisessig 95:12:5 getrennt, die einzelnen Substanzzonen herausgekratzt und mit Methanol eluiert. Das Kieselgel wurde abzentrifugiert, die überstehende methanolische Lösung, eingeengt und der Rückstand mit bidestilliertem Wasser aufgenommen und den Teströhrchen, die bereits je 5 ml steriles Minimalmedium enthielten, zugesetzt. In diese Lösungen wurden die Restmutanten eingeimpft und bei 30° C bebrütet.

Ergebnisse:

Substanzen	Testmutanten				
	E 40	E 107	HK 51	K 68	try 8
Indolderivat I_2	17;40;52	13;37;67	11;13;13	12;12;13	9;10;12
Indolderivat I_3	13;14;14	13; 12; 13	13;12;13	11;13;14	11;12;12
Indol	17;40;76	14;70;95	9; 11;13	17;32;42	18;29;42
Anthranilsäure	19;59;100	11;13;13	10; 11;10	19;35;49	21;34;51
Indolyl-3-glycerin	11; 11;12	10;12;12	12;12;12	10; 11; 11	12; 11;11
Nullwerte	9; 10;10	10; 11;10	9; 9; 11	10; 10;10	11;10;10

Die Werte geben die Trübung, gemessen mit dem Lange-Photometer, nach 15, 26 und 48 Stunden an.

2.) Mit den sterilen Minimalmedien nach Akkumulation

Die Minimalmedien wurden nach 2-tägiger Akkumulation unter sterilen Bedingungen von den Hefezellen befreit und jeweils 5 ml des sterilen zellfreien Minimalmediums zu 5 ml frischem sterilem Minimalmedium zugegeben. In diese Testlösungen wurden die Mutanten angeimpft und bei 30° C bebrütet.

Minimalmedien nach Akkumulation der Mutanten	Testmutanten			
	E 40	E 107	HK 51	try 8
E 107	40;54	24;46	10;12	29;39
HK 51	39;65	21;47	11; 11	32;45
E 40	11; 12	10; 11	11; 11	11; 12

b) Wachstum der Mutante E 107 mit 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2

Zu 500 ml sterilem Hefeminimalmedium wurde unter möglichst sterilen Bedingungen 25 mg 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 (50 γ/ml) gegeben. Die Hefemutante E 107 wurde angeimpft. Nach 3-tägigem Bebrüten bei 30° C war gutes Wachstum zu beobachten. Die Hefezellen wurden darauf abfiltriert und die kaum blau fluoreszierende Kulturflüssigkeit durch Extraktion mit Essigester und anschließende Chromatographie der Essigesterphase auf die darin enthaltenen Akkumulate untersucht. Neben großen Mengen Ausgangsmaterial (19 mg) konnten relativ viel 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol (4 mg) und geringe Mengen Anthranilsäure gefunden werden.

c) Enzymatische Umwandlung von 3-Indolyl-(3)-glycerin-l-phosphorsäure

Indolyl-3-glycerinphosphat (ca. 1/2 - 1 mg) wurde unter geeigneten Bedingungen mit dem Enzymrohextrakt der Hefemangelmutante E 107 inkubiert. Der Inkubationsansatz enthielt:

1 ml Substratlösung (ca. 2 mg IGP/2ml)
10 ml Enzymlösung (bereitet aus 18,5 g feuchter Hefemasse der E 107)
0,2 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Lösung (450 mg/100 ml)
0,4 ml ATP-Lösung (74 mg/10 ml)
0,2 ml DPN-Lösung (10 mg/10 ml)
20 ml Trispuffer p_H 7,4
5 mg Yeast-Extrakt

Der Ansatz wurde 2 Stunden bei 30° C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Enzymansatz im Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand mehrmals mit Methanol ausgezogen. Im Methanolextrakt ließ sich in Chloroform/Methanol/Eisessig bei R_F 0,5-0,6 gut 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 nachweisen, während bei R_F 0,8-0,85 geringe Mengen an 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol auftraten. Am Start ließ sich außerdem mit Prochazka Reagens ein weiterer intensiver Indol-3-derivat-Fleck sichtbar machen, der außerdem positiv mit Ammoniummolybdat/Ascorbinsäure auf Phosphatgruppen reagiert. Nach Papierchromatographie im System Isopropanol/Ammoniak/Wasser 100:10:25 ließen sich mit Prochazka-Reagens 6 gut aufgetrennte Indol-3-derivate nachweisen.

R_F 0,15	ganz wenig 3-Indolylglycerin-l-phosphorsäure
R_F 0,25-0,3	(Hauptmenge) - Phosphat positiv
R_F 0,4	relativ wenig

R_F 0,75	wenig Indolyl-3-glycerin
R_F 0,8-0,85	3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2
R_F 0,9	2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol

d) Behandlung der phosphatpositiven Indolderivate mit Polidase S

Die beiden phosphatpositiven Flecke bei den R_F-Werten 0,25-0,3 und 0,4 wurden aus mehreren Papierchromatogrammen ausgeschnitten, mit bidest. Wasser eluiert und mit der Phosphatase-haltigen Polidase S (Schwarz Laboratories, Inc. New York) 2 Stunden bei 30° C inkubiert:

Substratlösung vom Papierchromatogramm:
0,5 g Polidase S gelöst in 5 ml Trispuffer p_H 7,4
0,2 ml $MgSO_4 \cdot 7H_2O$-Lösung (450 mg/100 ml)
0,4 ml ATP-Lösung (74 mg/10 ml)
20 ml Trispufferlösung p_H 7,4

Der Inkubationsansatz wurde wie oben auf die entstandenen Produkte aufgearbeitet. Aus R_F 0,25-0,3 erhielt man nach der Behandlung mit Polidase 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 , während sich im Inkubationsansatz der Substanz bei R_F = 0,4 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol nachweisen ließ.

VI. Nachweis von Indolyl-3-glycerin und 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure bei Mutanten von E. coli

a) Die Mutanten E.coli 1-2, 1-3 und 15-169 wurden unter Belüftung vorgezüchtet. Bereits nach einem Tag waren die Bakterienkulturen voll angewachsen und konnten nach Abzentrifugieren

und Auswaschen unter sterilen Bedingungen in Minimalmedien gebracht werden. Nach einer Akkumulationsdauer von 2 Tagen wurden die Bakterienzellen abfiltriert, die klaren Kulturflüssigkeiten im Vakuum zur Trockene eingeengt und der trockene Rückstand mehrmals mit Methanol/Wasser 80:20 extrahiert. Nach Abdestillieren der Lösungsmittel wurde der feste Rückstand mit 2 ml dest. Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung im System Isopropanol/Ammoniak/Wasser 100:25:10 getrennt. Man erhielt drei scharf getrennte Indolderivate bei

R_F = 0,15 - 0,2	geringe Konzentration
R_F = 0,7 - 0,75	sehr viel Indolylglycerin
R_F = 0,8 - 0,85	wenig 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2

Das Indolderivat R_F 0,15-0,2 erwies sich durch Vergleich mit authentischer Substanz als 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure. In dem genannten System waren die beiden Substanzen, übereinander aufgetragen, bis R_F = 0,15-0,2 gewandert, im System Butanol/Pyridin/5 proz. Trichloressigsäure (40:20:45) bis R_F=0,7 .

b) Akkumulation unter Zusatz von Natriumfluorid und Äthylendiamintetraessigsäure

Die Mutanten wurden wie oben vorgezüchtet und anschließend in Minimalmedien gebracht, denen verschiedene Mengen an Natriumfluorid und Äthylendiamintetraessigsäure zugesetzt waren. Nach derselben Akkumulationsdauer wurde wie oben auf die Akkumulate aufgearbeitet und das Verhältnis Indolylglycerin/Indolylglycerinphosphat halbquantitativ durch Messung der UV-Absorptionen bei 282 nm bestimmt.

a) Minimalmedium ohne Zusatz:	E_{IG}/E_{IGP} = 9,05
b) Minimalmedium 0,01 molar an NaF :	keine Veränderung der Akkumulationsprodukte E_{IG}/E_{IGP} = 8,5

c) 0,02 molar an NaF : keine sichtbare Veränderung der Akkumulationsprodukte $E_{IG}/E_{IGP} = 8,9$

d) 0,01 molar an NaF und 0,01 molar an AEDTE : keine Änderung $E_{IG}/E_{IGP} = 8,7$

e) 0,05 molar an NaF : Es konnten keine Akkumulate mehr nachgewiesen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Biochemische Mangelmutanten akkumulieren im allgemeinen das Zwischenprodukt einer Biosynthesekette, hinter dem sie genetisch blockiert sind. Liegt der genetische Block dagegen hinter einer Verzweigungsstelle, so werden die Akkumulationsverhältnisse verwickelter. Wie am Beispiel der Mangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae mit genetischem Block unmittelbar hinter der Verzweigungsstelle in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren gezeigt werden konnte, werden in diesem Falle unter Akkumulationsbedingungen Gemische aus mehreren Substanzen angehäuft, die durch Ausweichreaktionen in die anderen Zweige der Aromatenbiosynthesekette zustande kommen. Auch Mutanten von Escherichia coli und Salmonella typhimurium zeigen das gleiche Phänomen.

Die Beeinflussung der Akkumulatbildung durch 4-Methyltryptophan, p-Fluorphenylalanin und m-Fluortyrosin wird geschildert. 4-Methyltryptophan hemmt durch Rückkopplung die Tryptophanbiosynthese. Der Zusatz von 4-Methyltryptophan führt deshalb bei einer Phenylalanin$^-$-Tyrosin$^-$-Mutante zur erhöhten Akkumulation von Chorisminsäure. Einen spezifischen Hemmeffekt entfaltet auch p-Fluorphenylalanin auf die Phenylalaninbiosynthese. Bei Tryptophan$^-$- und Tyrosin$^-$-Mutanten, die unmittelbar hinter dem Verzweigungsprodukt blockiert sind, läßt sich der Phenylalaninzweig durch p-Fluorphenylalanin soweit hemmen, daß auch bei diesen Mutanten erhöhtes Auftreten von Chorisminsäure beobachtet wird. Dagegen konnte mit m-Fluortyrosin weder bei einer Tryptophan$^-$-Mutante noch bei einer Phenylalanin$^-$-Mutante eine Hemmung des Tyrosinzweiges erreicht werden.

Der Nachweis von Tyrosol, Tryptophol und Phenyläthanol im Akkumulatgemisch bei verschiedenen Hefemutanten veranlaßte eine

genauere Untersuchung des Abbaues der natürlichen aromatischen Aminosäuren durch Hefe. Der Abbauweg verläuft bei diesen Aminosäuren über oxydative Desaminierung, Reduktion und Decarboxylierung zu den entsprechenden um ein C-Atom verkürzten Alkoholen. Bei Tyrosin und Phenylalanin ließ sich außerdem p-Hydroxybenzoesäure nachweisen. In einer analogen Reaktionsfolge werden auch p-Fluorphenylalanin und - in geringerem Maße - 4-Methyltryptophan abgebaut.

Ein Hefewildstamm ist auch in der Lage, Vorprodukte der Aromatenbiosynthese in Folgeprodukte umzuwandeln. So konnte die Bildung von Chorisminsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Anthranilsäure, p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Phenylbrenztraubensäure und Tyrosol aus Shikimisäure gezeigt werden. Bei einem Wildstamm von Escherichia coli treten unter diesen Bedingungen außerdem 2,3-Dihydroxybenzoesäure und 3,4-Dihydroxybenzoesäure auf. Diese beiden Verbindungen konnten bei Hefe nicht gefunden werden.
Die Umwandlung der Chorisminsäure in Anthranilsäure mit den dabei möglichen Vorprodukten und Kunstprodukten wird diskutiert. Die Reaktionsschritte von der Anthranilsäure über Indol in Tryptophan waren bei Hefe bisher noch kaum untersucht worden. Bei geeignet blockierten Tryptophanmangelmutanten von Saccharomyces cerevisiae ließen sich Anthranilsäure und zwei bisher noch nicht beschriebene Anthranilsäurederivate nachweisen, die wahrscheinlich Ester aus Anthranilsäure und Glycolaldehyd bzw. Ribose darstellen.
1-(N-o-Carboxyphenylamino)-1-desoxy-D-ribulose wurde erstmals als Akkumulat bei Saccharomyces cerevisiae gefunden. Indolyl-3-glycerin und Indol traten bei den untersuchten Hefemutanten nicht auf. Dafür ließen sich zwei Indolderivate isolieren, deren Kon-

stitution zu 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol und 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 aufgeklärt wurde. 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 konnte aus Indol und Glycerinaldehydacetal auch synthetisch gewonnen werden. Die beiden Indolderivate ließen sich außerdem unter saurer Katalyse aus Indolyl-3-glycerin darstellen. Bei niedrigem p_H-Wert bildete sich 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol auch aus 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 unter Abspaltung von Indol. 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol kann als vinyloges Amadori-Umlagerungsprodukt des Indolylglycerins aufgefaßt werden.

Die enzymatische Bildung der Phosphorsäureester dieser beiden Indolverbindungen aus 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure gelang mit Hilfe von Enzymrohextrakten.

Bei ähnlich blockierten Mutanten von Escherichia coli ließ sich neben großen Mengen Indolyl-3-glycerin nur wenig 3,3-Diindolyl-(3)-propandiol-1,2 nachweisen, während 2-Oxo-3-indolyl-(3)-propanol nicht auftrat.

Bei diesen Mutanten gelang außerdem der Nachweis von 3-Indolyl-(3)-glycerin-1-phosphorsäure.

Durch Zusatz von Phosphataseinhibitoren ließ sich die Menge des letztgenannten Akkumulates jedoch nicht steigern.

LITERATURVERZEICHNIS

1 B.D. Davis, J.biol. Chemistry 220, 477 (1956).

2 P.R. Srinivasan u. D.B. Sprinson, J.biol.Chemistry 234, 716 (1959).

3 L.C. Smith, J.M. Ravel, S.R. Lax u. W. Shive, J.biol.Chemistry 237, 3566 (1962).

4 K.D. Brown und C.H. Doy, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 77, 170 (1963)

5 P.R. Srinivasan u. J. Rothschild, J.biol. Chemistry 238, 3176 (1963).

6 J.J. Salomon u.B.D. Davis, J.Amer. chem.Soc. 75, 5567 (1953).

7 H.T. Shigeura u.D.B. Sprinson, Federation Proc. 11, 286 (1956).

8 U. Weiss u. E. S. Mingioli, J.Amer. chem.Soc. 78, 2894 (1956).

9 J.G. Levin u.D.B. Sprinson, Biochem. biophysic. Res. Comm. 3, 157 (1960).

10 J.G.Levin u.D.B.Sprinson, J.biol.Chemistry 239, 1142 (1964).

11 M.I. Gibson u. F. Gibson, Biochem. J. 90, 248 (1964).

12 F. Gibson, Biochem. J. 90, 256 (1964).

13 J.M. Edwards, F.Gibson, L.Jackman, J.S. Shannon, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 93, 78 (1964).

14 R.G.H. Cotton u.F. Gibson, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 100, 76 (1965).

15 E.E. Snell, Arch.Biochim.Biophysics 2, 389 (1943).

16 E.L. Tatum, D.M.Bonner u.G.W. Beadle, Arch. Biochim. Biophysics 3, 477 (1944).

17 E.L. Tatum u. D.M.Bonner, J.Proc.Natl.Acad.Sci. US 30, 30 (1944).

18 C.Yanofsky, J.biol.Chemistry 223, 171 (1956).

19 C.H. Doy u. F. Gibson, Biochem.J. 72, 586 (1959).

20 C.W.H. Partridge, D.M.Bonner, u. C. Yanofsky, J.biol. Chemistry 194, 260 (1952).

21 J.F.Nyc u. H.K. Mitchell, J.biol.Chemistry 179, 283 (1949).

22 C.Yanofsky, Biocheim.biophysica Acta (Amsterdam) 20, 483 (1956).

23 F. Gibson, M.J. Jones u. H.Teltscher, Nature (London), 175, 853 (1955).

24 F. Lingens, H.J. Burkhardt, H.Hellmann u. F. Kaudewitz Z.Naturforsch. 12b, 493 (1957).

25 F. Lingens u.H. Hellmann, Z. Naturforsch. 13b, 462 (1958).

26 W.W. Umbreit, W.A.Wood u. J.C. Gunsalus, J.biol. Chemistry 165, 731 (1946).

27 C. Yanofsky, J.biol.Chemistry 194, 279 (1952).

28 C. Yanofsky, J.biol.Chemistry 223, 171 (1956).

29 P. Fildes, Brit. J. exp. Pathol. 22, 315 (1940).

30 U. Weiss, C. Gilvarg, E.S. Mingioli u. B.D. Davis, Science (Washington) 119, 774 (1954).

31 R.W. Colburn u. E. L. Tatum, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 97, 442 (1965).

32 F. Gibson, M.I. Gibson u. G.B. Cox, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 82, 636 (1964).

33 F. Lingens u. H. Hellmann, Z. Naturforsch. 13b, 462 (1958).

34 B.D. Davis u. E.S. Mingioli, J.Bacteriol. 66 129 (1953).

35 F. Lingens. u. W. Lück, Angew. Chemie 76, 51 (1964).

36 L.W. Parks u. H.C. Douglas, Biochim. biophysica Acta, (Amsterdam) 23, 207 (1957).

37 C.H. Smith u. C. Yanofsky, J.biol.Chemistry 235, 2051 (1960).

38 O.H. Doy, Rev. of Pure and Applied Chem. 10, 185 (1960).

39 W. Lück, Dissertation, Tübingen 1964.

40 A.A. Eddy u.B. Kirsop, J.Inst. Brewing 61, 382 (1955).

41 A.A. Eddy u.B. Kirsop, J. Gen.Microbiol. 13, XIII (1955).

42 F. Lingens u. W. Lück, Z.physiol.Chem. 333, 190 (1963).

43 K. Kutscher, Z. Physiol.Chem. 114, 245 (1921).

44 E. Cabib u. F. Leloir, J.biol.Chemistry 206, 779 (1954).

45 J.S. Harrison u. W.E. Trevelyan, Nature (London) 200, 1189 (1963).

46 S. Spiegelman u. H.O. Havorson, "Amino Acid Metabolism" S. 124 John Hopkins Press, Baltimore (1955).

47 N.A. Krasilmikoo u. I.V. Asseva, Biol.Sciences Sections 141, 1046 (1961) Amerik. Übersetzung.

48 T. Herrera, W.H. Peterson u. E.J. Cooper, Arch. Biochim. Biophysics 63, 131 (1956).

49 M.J. Lewis u.H.J. Phaff, J.Bacteriol. 89, 960 (1965).

50 C.B. van Niel, Bacteriol. Revs. 8, 1 (1944).

51 D.A.L. Davies, Advances in Carbohydrate Chem. 15, 271 (1960).

52 W. Stich u. H. Eisgruber, Z.physiol.Chem. 287, 19 (1951).

53 P.P.Slonimski, "La Formation des Enzymes Respiratoires chez la Levure" Masson, Paris, 1953.

54 R.E.H. Nicholas u. C.Rimington, Biochem. J. 48, 306 (1952).

55 C.H. Doy u. F. Gibson, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 50, 495 (1961).

56 I. Smith, Chromatographic Techniques, Heinemann (London) 1958.

57 A.J. Pittard, F. Gibson u. C.H. Doy, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 49, 485 (1961).

58 C.H. Doy u. F. Gibson, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 50, 495 (1961).

59 A.J. Pittard, F. Gibson u. C.H. Doy, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 57, 290 (1962).

60 V.E. Tyler, jr., K.Mothes, D. Gröger u. H.G. Floss, Tetrahedron Letters 1964, 593.

61 T. Ito u. J.B. Neilands, J.Amer.chem.Soc. 80, 4645 (1958).

62 G. Terni, T. Enatzu, u.S. Tabota, J.Ferment,Technol. 39, 224 (1961).

63 J.R. Dyer, H. Hednig u. C.P. Schaffner, J.org.Chemistry 29, 2802 (1964).

64 J. Monod u. G.Cohen-Bazire, C.R.hebd.Seances Acad.Sci. 236, 530 (1953).

65 H.J. Vogel, Proc.nat.Acad.Sci. USA 43, 491 (1957).

66 E.R. Stadtman, Bacteriol.Revs. 27, 170 (1963).

67 H. De Robichon-Szulmajster u. D. Corrivaux, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam), 73, 248 (1963).

68 P.A. Trudinger u. G.N. Coben, Biochem. J. 62, 488 (1956).

69 F. Lingens, Z.physiol.Chem. 331, 56 (1963).

70 F. Lingens, H. Kraus u. S. Lingens, Z.physiol.Chem. 339, 1 (1964).

71 J.S. Gots u. E.G. Gollup, Proc. of the Soc. f.Exp.Biol. and Medicine 2, 207 (1957).

72 H.S. Moyed, J.biol.Chemistry 236, 2261 (1961).

73 E. Previc u.S. Binkley, Biochem.biophysic. Res.Comm.16, 162 (1964).

74 P.D. Boyer, P.J. Evans u. P.H. Philips, J.Pharmacol. 73, 176 (1941).

75 C. Ratledge, Nature (London), 203, 428 (1964).

76 F. Ehrlich, Ber.dtsch.chem.Ges. 45, 883 (1912).

77 W.A. Wood, I.C. Gunsalus u. V. Umbreit, J.biol.Chemistry 170, 313 (1947).

78 J.C. Hoogerheide u. W. Kochalaty, Biochem.J. 32, 949 (1938).

79 G. Ballin, J.Chromatogr. 16, 152 (1964).

80 P.R. Srinivasan u. A. Rivera jr., Biochemistry 2, 1059 (1963).

81 F. Lingens u. W. Goebel, Z.physiol.Chem. im Druck

82 J.G. Levin u. D.B. Sprinson, J.biol.Chemistry 239, 1142 (1964).

83 J.A. De Moss, J.biol.Chemistry 240, 1231 (1965).

84 F. Lingens, B. Sprößler u. W. Goebel, in Vorbereitung.

85 B. Sprößler, Diplomarbeit, Tübingen 1964.

86 E. Schraven, Dissertation, Tübingen 1962.

87 J.B. Brown, H.B. Heubert u.E.R.H. Jones, J.Chem. Soc. (London) 1952, 3172

88 C. Yanofsky, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 20, 438 (1956).

89 Z. Zinner, A. Koine u. H. Nimz, Chem.Ber. 93, 2705 (1960).

90 Hasselstrom, Ann. Acad. Sci. Fennicae 13, 18 (1930).

91 P. Ehrlich, Dtsch. med. Wschr. (April 1901).

92 R. Kuhn u. F. Weygand, Ber.dtsch.chem.Ges. 70, 769 (1937).

93 F. Micheel u. J. Dijong, Liebigs Ann.Chem. 658, 120 (1962).

94 H.D. Garrick, H. Elberfeld u. S.R. Suskind, Science (Washington) 145, 491 (1964).

95 J.E. Falk,"Porphyrins and Metalloporphyrins" S. 126, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964

96 W. Zillig u. H. Hölzel, Z.physiol.Chemie 312, 140 (1958).

97 F. Kögl u. D.G. Kostermanns, Z.physiol.Chemie 228, 113 (1934).

98 K. Hirai, Biochem. Z. 114, 71 (1921).

99 A. Meister, "Biochemistry of the Amino Acids" Vol. II, S. 884, Academic Press, New York, London (1965).

LEBENSLAUF

Am 19. September 1939 wurde ich als Sohn des Buchhalters Walter Goebel und seiner Ehefrau Ruth, geb. Rademacher, in Laurahütte Krs. Kattowitz / Oberschlesien geboren.

1945 mußten wir Oberschlesien verlassen und kamen nach Adelmannsfelden Krs. Aalen, wo ich 4 Jahre die Grundschule besuchte. Anschließend trat ich in das humanistische Peutinger-Gymnasium in Ellwangen ein, wo ich 6 Jahre lang Schüler war. Die letzten 3 Oberschuljahre verbrachte ich auf dem Humboldt-Gymnasium in Ulm, wo ich Ostern 1958 die Reifeprüfung bestand.

Mit dem Chemiestudium begann ich im Sommersemester 1958 an der Universität Tübingen. Hier legte ich im Mai 1961 das Vorexamen und im Mai 1963 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab.

Seither war ich mit der Durchführung der Diplom- und Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Dozenten Dr. Lingens beschäftigt.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Chemie: E. Bayer, K. Brodersen, W. Bues, H. Hellmann, G. Kortüm, F. Lingens, E. Müller, G. Opitz, W. Rüdorff

In Physik und Mathematik: H. Krüger, G. Möllenstedt, R. Mühleisen, W. Schweizer

In Urgeschichte: G. Riek